

RENE DOS REIS PIORNEDO

ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DE *Gochnatia polymorpha ssp. floccosa* EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador(a): Prof. Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya.

Co-orientador(a): Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio.

CURITIBA

2010



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

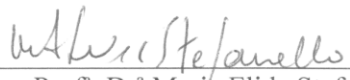


PARECER

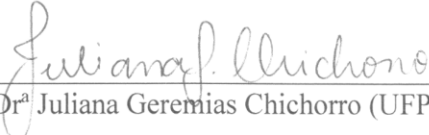
A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado "Atividade Antiinflamatória de *gochnatia polymorpha ssp floccosa* em Camundongos", de autoria do pós-graduando **RENÊ DOS REIS PIORNEDO**, sob orientação da Prof^ª. Dr^ª. Candida Aparecida Leite Kassuya (UFPR) e composta pelos professores: Prof^ª. Dr^ª. Candida Aparecida Leite Kassuya (UFPR); Prof^ª. Dr^ª Maria Elida Stefanello (UFPR); Prof^ª Dr^ª Juliana Geremias Chichorro (UFPR). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o pós-graduando foi APROVADO. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pela sua orientadora. Em Curitiba, 19 de novembro de 2010.



Prof^ª. Dr^ª. Candida Aparecida Leite Kassuya (UFPR)



Prof^ª. Dr^ª Maria Elida Stefanello (UFPR)



Prof^ª Dr^ª Juliana Geremias Chichorro (UFPR)



1 **ATA DO JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

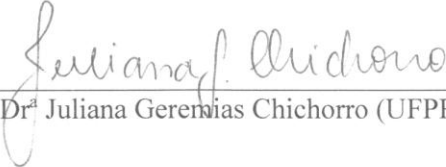
2 Ao décimo nono dia do mês de novembro do ano de dois mil e dez, às dez horas e
3 trinta minutos, no Anfiteatro nº 11 do Setor de Ciências Biológicas da Universidade
4 Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado de
5 autoria do pós-graduando em Farmacologia **RENÊ DOS REIS PIORNEDO**, intitulada:
6 “Atividade Antiinflamatória de *gochnatia polymorpha ssp floccosa* em Camundongos”,
7 sob orientação da Profª Drª Candida Aparecida Leite Kassuya e composta pelos professores:
8 Profª Drª Candida Aparecida Leite Kassuya (UFPR); Profª Drª Maria Elida Stefanello
9 (UFPR); Profª Drª Juliana Geremias Chichorro (UFPR). A Banca Examinadora iniciou os
10 trabalhos. O candidato teve quarenta e cinco minutos para expor oralmente seu trabalho,
11 sendo em seguida argüido durante quinze minutos por cada um dos membros da Banca, e
12 tendo trinta minutos para responder a cada uma das arguições. No final a Comissão
13 Examinadora emitiu o seguinte parecer: APROVADO. De acordo com o
14 Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, o pós-graduando foi
15 aprovado. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão
16 conferidas pela sua orientadora. Nada mais havendo a tratar, a Presidente deu por
17 encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata, que será assinada pela Presidente e
18 pelos demais Membros da Banca Examinadora, em Curitiba, 19 de novembro de 2010.

19
20
21


Profª Drª Candida Aparecida Leite Kassuya (Orientadora- UFPR)



Profª Drª Maria Elida Stefanello (UFPR)



Profª Drª Juliana Geremias Chichorro (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais Aparecido Piornedo e Neide dos Reis Piornedo por simplesmente tudo. Amo vocês!

Ao meu irmão Ricardo Reis Piornedo pelo companheirismo, apoio, amizade e carinho e aos meus familiares pelo apoio.

À minha orientadora Prof. Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya e ao meu co-orientador Aleksander Roberto Zamprônio por todo o conhecimento que me proporcionaram e pela paciência, compreensão e dedicação para a realização desse trabalho. Muito obrigado!

À doutoranda em farmacologia e grande amiga Priscila de Souza, à aluna Regiane Lauriano Batista Strapasson e à Prof. Dra. Mária Élide Alves Stefanello, ambas do Departamento de Química desta instituição, que contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos meus ex-professores de farmacologia e toxicologia da Universidade Paranaense (UNIPAR) e agora colegas de pós-graduação Arquimedes Gasparotto Jr., Émerson Luiz Botelho Lourenço e Irinéia Paulina Baretta, pelo total apoio e amizade.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná pelo carinho, amizade e conhecimento a mim proporcionado.

Aos funcionários do Departamento e a todos os colegas da pós-graduação.

Ao pessoal do laboratório de Inflamação, Dor e Febre, com os quais passei grande parte desses longos dois anos e, sem os quais, esses dias não seriam tão alegres, divertidos e especiais. Muito obrigado pela amizade e pelo apoio.

RESUMO

As plantas medicinais constituem importante fonte de novas drogas e o ensaio biomonitorado é uma ferramenta útil para desenvolvimento de novos compostos oriundos de plantas medicinais. Dentre as várias plantas utilizadas pela população para fins medicinais, encontra-se a *Gochnatia polymorpha*, conhecida popularmente como cambará e utilizada no tratamento de resfriados, tosse, outras afecções do trato respiratório e doenças inflamatórias. O objetivo deste trabalho foi avaliar possível atividade antiinflamatória do extrato etanólico da *G. polymorpha* ssp. *floccosa* (EEGP) em camundongos submetidos aos modelos de edema de pata e inflamação na bolsa de ar induzido pela carragenina (Cg) e realizar um fracionamento biomonitorado do extrato a fim de identificar e isolar o(s) composto(s) com propriedade antiinflamatória(s). O tratamento por via oral (v.o.) dos animais com o EEGP nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg inibiu, $41,2 \pm 12,8\%$, $34,8 \pm 6,0\%$ e $60,4 \pm 9,7\%$, respectivamente, o edema de pata induzido pela Cg após duas horas da aplicação do estímulo inflamatório em camundongos. A administração de EEGP nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg foi capaz de inibir significativamente ($47,9 \pm 12,5$, $51,7 \pm 15,2$ e $60,9 \pm 13,7\%$, respectivamente) o extravasamento plasmático, e a migração celular ($37,2 \pm 12,5$, $62,6 \pm 5,0$ e $54,3 \pm 6,8\%$, respectivamente) no modelo de inflamação induzido pela bolsa de ar quatro horas após a Cg. A fração butanólica (BT) na dose de 20 mg/kg, e a fração diclorometano (DCM) na dose de 50 mg/kg, inibiram significativamente ($70,2 \pm 11,5\%$ e $44,5 \pm 12,8$, respectivamente) o edema de pata induzido pela Cg duas horas após o estímulo inflamatório. No modelo da bolsa de ar o tratamento por via oral dos animais com BT (20 mg/kg) e DCM (50 mg/kg) inibiram significativamente o extravasamento plasmático ($52,4 \pm 15,0\%$ e $58,2 \pm 11,2\%$, respectivamente), enquanto que somente a fração DCM inibiu

de forma significativa ($29,5 \pm 10,6\%$) a migração de leucócitos para a bolsa de ar quatro horas após a injeção de Cg. Dois compostos foram isolados da fração DCM e identificados como acetato de bauerenila (GPC1) e 11, 13-diidrozaluzanina C (GPC2). O composto GPC2 (10 e 30 mg/kg) inibiu significativamente ($29,5 \pm 4,8$ e $31,7 \pm 5,4\%$, respectivamente) o edema de pata induzido pela Cg duas horas após o estímulo. O composto GPC1 (1 e 10 mg/kg, v.o.) não demonstrou atividade antiinflamatória. O composto GPC2 (3, 10 e 30 mg/kg, v.o.) inibiu de forma significativa a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no tecido seis horas após injeção de Cg ($30,6 \pm 9,4$, $51,3 \pm 3,4$ e $54,6 \pm 2,4\%$, respectivamente). Ainda, o tratamento por via oral dos animais com GPC2 (10 mg/kg) inibiu significativamente o extravasamento plasmático e a migração de leucócitos ($51,8 \pm 11,7$ e $54,4 \pm 21,8\%$, respectivamente) na bolsa de ar quatro horas após a injeção de Cg. Os resultados encontrados nesse trabalho demonstraram que o EEGP, bem como as frações BT e DCM possuem atividade antiinflamatória e, que o composto GPC2, uma lactona sesquiterpênica, é responsável, pelo menos em parte, por essa atividade.

ABSTRACT

Medicinal plants comprise an important source of new drugs and the bioassay-guided fractionation is an useful approach to isolate new compounds and drug leads from plants. Within the several plants utilized by the population to medicinal purposes, *Gochnatia polymorpha*, popularly known as cambará, has been utilized to treat cold, cough and other diseases of the respiratory tract and inflammatory diseases. The aim of this work was to evaluate a potential antiinflammatory activity of the ethanolic extract from *G. polymorpha* ssp. *floccosa* in mice subjected to carrageenan(Cg)-induced paw edema and Cg-induced inflammation into the air pouch. In addition, perform a bioassay-guided monitoring from the extract aiming at identified and isolate compounds possibly responsible for the antiinflammatory activity of the plant. The treatment of the animals with the ethanolic extratc from *G. polymorpha* ssp. *floccosa* (EEGP) at doses of 30, 100 and 300 mg/kg, p.o. inhibited ($41.2 \pm 12.8\%$, $34.8 \pm 6.0\%$ and $60.4 \pm 9.7\%$, respectively) the Cg-induced paw edema formation in mice two hours after the inflammatory stimulus. EEGP at doses of 30, 100 and 300 mg/kg, p.o., inhibited significantly (47.9 ± 12.5 , 51.7 ± 15.2 and $60.9 \pm 13.7\%$, respectively) the plasma leakage, and (37.2 ± 12.5 , 62.6 ± 5.0 and $54.3 \pm 6.8\%$, respectively) the cellular migration to the air pouch four hours after inflammatory stimulus. Both the butanolic fraction (BT) at the dose of 20 mg/kg, p.o., and dichloromethane fraction (DCM) at the dose of 50 mg/kg, p.o., inhibited significantly ($70.2 \pm 11.5\%$ and 44.5 ± 12.8 , respectively) the Cg-induced paw edema two hours after inflammatory stimulus. In the air pouch model of inflammation, both the treatment of the animals with BT (20 mg/kg, p.o.) and DCM (50 mg/kg, p.o) reduced significantly the plasma leakage ($52.42 \pm 15.0\%$ and $58.2 \pm 11.2\%$, respectively), while only DCM inhibited significantly ($29.53 \pm 10.6\%$) the leukocyte migration to the air pouch, four hours

after Cg injection. Two compounds have been isolated from DCM fraction and identified as bauerenyl acetate (GPC1) and 11, 13-dihydrozaluzanin C (GPC2). The compound GPC2 (at 10 and 30 mg/kg, p.o.) inhibited significantly (29.5 ± 4.8 and $31.7 \pm 5.4\%$, respectively) the Cg-induced paw edema formation two hours after stimulus. The compound GPC1 (at 1 and 10 mg/kg, p.o.) did not showed antiinflammatory activity. The compound GPC2 (3, 10 and 30 mg/kg, p.o.) also reduced significantly the myeloperoxidase (MPO) enzyme activity into the tissue six hours after Cg injection (30.6 ± 9.4 , 51.3 ± 3.4 and $54.6 \pm 2.4\%$, respectively). Moreover, the treatment of the animals with GPC2 (at 10 mg/kg, p.o.) reduced significantly the plasma leakage and leukocyte migration (51.8 ± 11.7 and $54.4 \pm 21.8\%$, respectively) to the air pouch four hours after Cg injection into the cavity. Results of this work showed that the EEGP, as well as, both the BT and DCM fraction contain antiinflammatory activity and, that the compound GPC2, a sesquiterpene lactone, is responsible, at least in part, to this activity.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µm – micrômetro

AA – ácido araquidônico

AcOEt – acetato de etila

ADP – adenosina difosfato

AINE – antiinflamatório não esteroide -

ANOVA – análise de variância

AP-1 – proteína ativadora 1

BT – butanólica

CC – cromatografia em coluna

CCDC – cromatografia em camada delgada comparativa

CCDP – cromatografia em camada delgada preparativa

CD – cluster differentiation

Cg – carragenina

COX – ciclooxigenase

CysLTs – cistenil leucotrienos

d – duplete

DCM – diclorometano

dd – duplo duplete

ddd – duplo duplo duplete

DNA – ácido desoxiribonucleico

dt – duplo triplete

E.P.M. – erro padrão da média

EEGP – extrato etanólico de *Gochnatia polymorpha*

ELISA – ensaio por imunossorção ligado à enzima

eNOS – óxido nítrico sintetase endotelial

EP – éter de petróleo

EPA – ácido eicosapentaenóico

EtOH – etanol

GM-CFS – fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos

GPC1 – Composto 1 de *G. polymorpha* (acetato de bauerenila)

GPC2 – Composto 2 de *G. polymorpha* (11, 13-diidrozaluzanina C)

GR – receptor de glicocorticóide

GRE – elemento de resposta ao glicocorticóide

HMBC – correlação heteronuclear em múltiplas ligações

Hsp – proteína do choque térmico (*Heat shock protein*)

HSQC – correlação heteronuclear em única ligação

Hz – hertz

i.pl. - intraplantar

ICAM-1 – molécula de adesão intercelular - 1

IkB – inibidor kB

IKK – quinase do IkB

IL – interleucina

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

LOX - lipooxigenase

LPS – lipopolissacarídeo

LT – leucotrienos

m - múltiplo

MAPK – proteína quinase ativada por mitógenos

mDO – mili densidade óptica

MeOH – metanol

mg/kg – miligramas por quilograma

MN – mononucleares

MPO – mieloperoxidase

NF-kB – fator nuclear - kB

nm – nanômetro

OMS – Organização Mundial da Saúde

v.o. – via oral

PAF – fator ativador de plaquetas

PBS – tampão fosfato

PECAM-1 – molécula de adesão plaqueta/endotélio

PGI₂ – prostaciclina

PG – prostaglandinas

PI3K – fosfatidilinositol-3 quinase

PLA₂ – fosfolipase A₂

PMN – polimorfonucleares

RNA – ácido ribonucléico

RMN – ressonância magnética nuclear

s – singleto

s.c. – subcutânea

s/ – singleto largo

t - tripleto

TLR – receptores toll-like

TNF- α – fator de necrose tumoral - α

TXA₄ – tromboxano A₄

VCAM-1 – molécula de adesão celular vascular - 1

VEGF – fator de crescimento vascular endotelial

δ – deslocamento químico

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Medicamentos aprovados e lançados no mercado no período de 01/1981 a 06/2006 e suas respectivas origens.

FIGURA 2 – Foto de *Gochnatia polymorpha* ssp.

FIGURA 3 – Estrutura química dos compostos acetato de bauerenila (A) e 11, 13-diidrozaluzanina C (B) de *G. polymorpha* ssp floccosa.

FIGURA 4 – Fluxograma demonstrativo do processo de extração e fracionamento do material botânico.

FIGURA 5 – Fluxograma resumido do processo de fracionamento e obtenção dos compostos a partir da fração DCM.

FIGURA 6 – Espectro de RMN ^1H (A) e RMN ^{13}C (B) do composto GPC1.

FIGURA 7 – Espectro de RMN ^1H (A) e RMN ^{13}C (B) do composto GPC2.

FIGURA 8 – Efeito do EEGP sobre a migração leucocitária e extravasamento plasmático induzido pela carragenina no modelo de inflamação na bolsa de ar

FIGURA 9 – Efeito do EEGP sobre o edema de pata induzido pela Cg em camundongos.

FIGURA 10 – Efeito das frações BT e DCM sobre a inflamação induzida pela Cg nos modelos de inflamação na bolsa de ar e edema de pata.

FIGURA 11 – Efeito de GPC1 e GPC2 sobre o edema de pata induzido pela Cg em camundongos.

FIGURA 12 – Efeito de GPC2 sobre o edema de pata e sobre o aumento da atividade da MPO induzida pela Cg.

FIGURA 13 – Efeito de GPC2 sobre a infiltração leucocitária e extravasamento plasmático induzido pela Cg no modelo de inflamação na bolsa de ar.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
1.1 Plantas Medicinais.....	1
1.2 Família <i>Asteraceae</i>	6
1.3. <i>G. polymorpha</i>	7
1.4 O processo inflamatório.....	11
1.4.1 Vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular	14
1.4.2 Migração celular.....	15
1.4.3 Mediadores do processo inflamatório.....	18
1.4.4 O fator de transcrição NF-kB.....	23
1.4.5 Fármacos antiinflamatórios	24
II. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 Estudos fitoquímicos	30
3.1.1 Material botânico – coleta e identificação.....	30
3.1.2 Preparação do extrato e frações	30
3.1.3 Isolamento e identificação dos compostos a partir da fração em CH ₂ Cl ₂	33
3.2 Estudos farmacológicos - avaliação da atividade antiinflamatória.....	34
3.2.1 Drogas e reagentes	34
3.2.2 Animais.....	34
3.2.3 Modelo de inflamação na bolsa de ar.....	34
3.2.4 Edema de pata induzido pela Cg	35
3.2.5 Atividade da MPO	36
3.2.6 Análise estatística	37
IV. RESULTADOS	38
4.1 Análise fitoquímica	38
4.2 Análise farmacológica – Avaliação da atividade antiinflamatória	42
4.2.1 Efeito do EEGP nos modelos de inflamação na bolsa de ar e edema de pata induzido pela Cg	42
4.2.2 Efeito das frações BT e DCM nos modelos de inflamação no bolsa de ar e edema de pata induzida pela Cg	46

4.2.3 Efeito dos compostos GPC1 e GPC2 obtidos da fração DCM nos modelos de inflamação no bolsa de ar e edema de pata induzido pela Cg	48
V. DISCUSSÃO	53
VI. CONCLUSÃO	63
VII. REFERÊNCIAS.....	64

I. INTRODUÇÃO

1.1 Plantas Medicinais

Desde os primórdios as plantas são utilizadas para fins medicinais. Um fato que demonstra, de certa forma, o impacto que as plantas medicinais exerceram sobre nosso atual entendimento sobre drogas – termo usado para denotar qualquer substância química, de uso terapêutico ou não – é a origem da palavra droga, do francês “*drogue*”, que significa erva seca (Lüllmann, 2005). Ainda hoje as plantas medicinais são bastante utilizadas pela população. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), devido à pobreza e falta de acesso aos medicamentos industrializados, 80% da população, principalmente em países subdesenvolvidos, faz uso de plantas medicinais no combate primário às doenças (Farnsworth *et al.*, 1985).

O uso de produtos naturais é certamente uma das estratégias mais bem sucedidas na descoberta de novos fármacos, dado comprovado pela maioria das inovações produzidas pelas grandes indústrias farmacêuticas nos últimos 50 anos (Ferris, 2001; Newman e Cragg, 2007). A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. A pesquisa com plantas medicinais é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimentos e agroquímicos (Phillipson e Anderson, 1989; Pinto *et al.*, 2002). A grande diversidade química das plantas faz delas a fonte de escolha para o isolamento de metabólitos farmacologicamente relevantes (Basso *et al.*, 2005). Aproximadamente 25% das drogas prescritas em todo o mundo são

oriundas de plantas, enquanto 11% das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS derivam exclusivamente de plantas (Rates, 2001). Com relação às drogas utilizadas no tratamento do câncer e drogas antimicrobianas, o envolvimento das plantas é muito maior, pois, cerca de 60% das drogas disponíveis no mercado ou em fase clínica de desenvolvimento são derivadas de produtos naturais, principalmente de plantas superiores. Newman e Cragg (2007) revisaram todas as novas drogas aprovadas para o tratamento de inúmeras condições patológicas desde janeiro de 1981 até junho de 2006 (figura 1). Um número total de 1.184 novas drogas foi constatado, das quais 30% são de origem totalmente sintética, 23% são compostos derivados de produtos naturais, 5% são compostos de ocorrência natural, 14% são oriundas de fontes biológicas, usualmente grandes peptídeos ou proteínas obtidas de organismos ou linhagens celulares por meio de processos biotecnológicos, 4% são vacinas, outros 4% são drogas sintetizadas com base em compostos de ocorrência natural e o restante são moléculas que mimetizam a estrutura química de compostos de ocorrência natural (p.ex. inibidores da enzima conversora de angiotensina que mimetizam a sequência C-terminal da angiotensina I) e compostos sintéticos modelados com base em inibidores naturais do alvo molecular de interesse (Cragg *et al.*, 1997; Newman *et al.*, 2003; Newman e Cragg, 2007). São inúmeros os exemplos de medicamentos que foram desenvolvidos, direta ou indiretamente, de fontes naturais, especialmente de plantas e são aplicados na clínica, incluindo entre outros a morfina (*Papaver somniferum*), a pilocarpina (*Pilocarpus jaborandi*), os digitálicos (*Digitalis purpurea*), os curares, a quinina (*Cinchona* spp), a artemisina (*Artemisia annua*), a atropina (*Atropa belladonna*), a escopolamina (*Datura stramonium*), o cromalin; vários medicamentos utilizados no tratamento do câncer, incluindo entre outros a vimblastina, vincristina

(*Catharanthus roseus*), taxol (*Taxus brevifolia*) e as campotequinas; as estatinas, utilizadas no tratamento das dislipidemias e vários imunossupressores e antibióticos (Calixto, 2001a). Muitos compostos oriundos de plantas foram e são importantes também na elucidação de fenômenos complexos relacionados à biologia celular e molecular (Calixto, 2001a). Outros compostos, embora não sejam úteis terapeuticamente, são aplicáveis como ferramentas experimentais. A nomenclatura atribuída a algumas moléculas receptoras como os receptores nicotínicos e muscarínicos da acetilcolina revelam claramente a importância que os produtos naturais tiveram no entendimento da fisiologia humana. Em algumas ocasiões a droga isolada de uma determinada planta não é aplicada diretamente como um fármaco, mas é útil como matéria prima para o desenvolvimento, ou seja, é utilizado como ponto de partida para a obtenção um derivado terapeuticamente relevante. Em outras ocasiões, uma droga de origem natural terapeuticamente útil pode ser modificada quimicamente para a obtenção de derivados com características farmacológicas otimizadas (Barreiro, 2001).

Os fitofármacos, fitoterápicos ou fitomedicamentos, medicamentos industrializados constituídos exclusivamente de material vegetal padronizado, também são detentores de um mercado extremamente lucrativo, de tal forma a renovar o interesse das grandes indústrias farmacêuticas por esse segmento. Alguns exemplos de fitofármacos são o ginkgo, kava pironas, ginseng, erva de São João, dentre outros que, normalmente, são comercializados na forma de extratos padronizados. (Calixto, 2000; Montanari e Bolzani, 2001). No entanto, a falta de estudos pré-clínicos e clínicos, ou estudos insuficientes para comprovar a eficácia e segurança de vários fitofármacos limitam a prescrição desses medicamentos (Calixto, 2000; 2005). No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são

consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. Muitas vezes essas plantas são, inclusive, empregadas para fins medicinais que não aqueles utilizados pelos silvícolas. A toxicidade das plantas medicinais e fitofármacos constituem um problema sério de saúde pública por não ser realizado adequadamente. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitofármacos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais (Veiga *et al.*, 2005). Estudos pré-clínicos e clínicos adequados que assegurem a segurança e eficácia dos fitofármacos, bem como, o controle de qualidade desses medicamentos são imprescindíveis para a consolidação desses medicamentos na prática clínica de forma eficaz e segura (Calixto, 2001b).

O reino vegetal parece uma fonte inesgotável de novas entidades químicas e novas drogas. Estima-se que haja cerca de 250.000 espécies de plantas superiores no planeta, das quais apenas uma pequena parcela foi estudada fitoquimicamente e, uma parcela menor ainda foi submetida à qualquer ensaio farmacológico (Hamburger e Hostettmann, 1991). Aproximadamente 70% das espécies de plantas superiores estão distribuídas em 12 países incluindo o Brasil. Os outros onze países são a Austrália, China, Colômbia, Equador, Índia, Indonésia, Madagascar, México, Peru e Zaire (Myers *et al.*, 2000). Portanto, o Brasil, devido à imensa biodiversidade, possui um gigantesco potencial para o desenvolvimento de programas para a descoberta de novas drogas a partir de plantas.

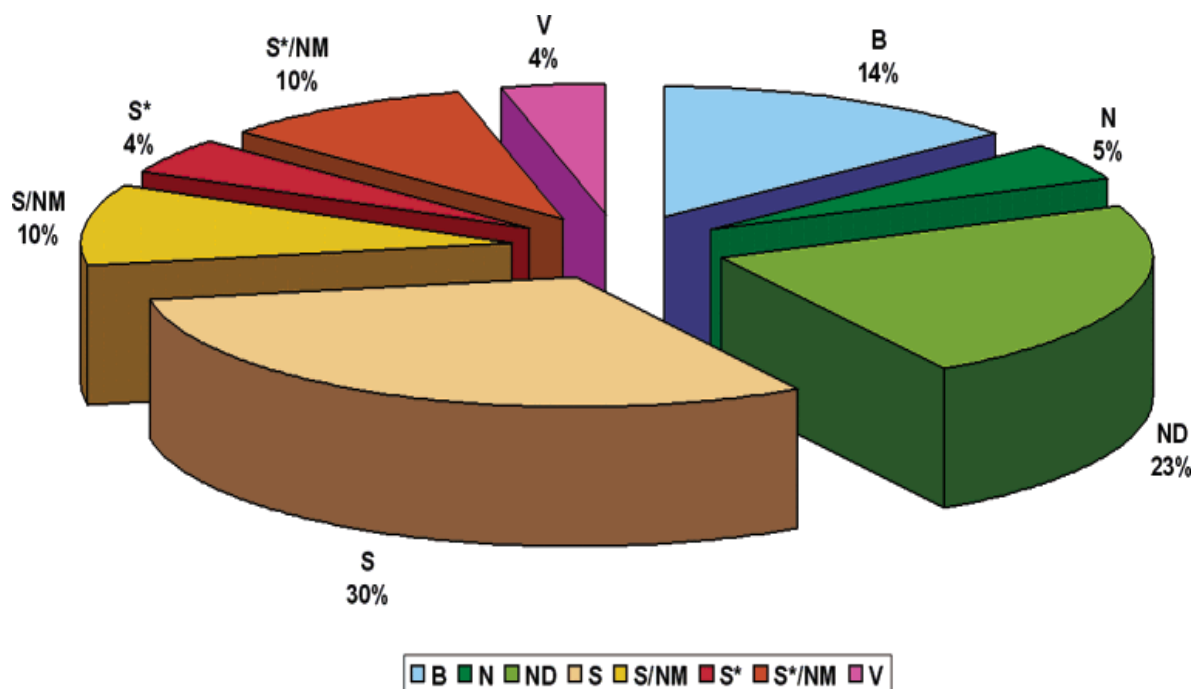


FIGURA 1 – DROGAS APROVADAS E LANÇADAS NO MERCADO NO PERÍODO DE 01/1981 A 06/2006 E SUAS RESPECTIVAS ORIGENS. Uma revisão de Newman e Cragg (2007) constatou 1.184 drogas aprovadas e lançadas no mercado no período de 01/1981 a 06/2006, e suas respectivas origens, classificando-as em diferentes grupos. S= drogas de origem totalmente sintética; ND= drogas derivadas de compostos de ocorrência natural (semi-sintéticos); N= compostos de ocorrência natural; B= produtos de fontes biológicas (usualmente peptídeos ou proteínas ou isolados de organismos/linhagens celulares ou obtidos por meios biotecnológicos; V= vacinas; S*= compostos sintetizados com base em grupos farmacofóricos de produtos naturais; S/NM= totalmente sintético, porém modelado com base em inibidores naturais do alvo molecular de interesse; S*/NM= compostos sintetizados que mimetizam a estrutura de compostos de ocorrência natural (p.ex. inibidores da enzima conversora de angiotensina, que mimetizam a sequência C-terminal da angiotensina I). Fonte: NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, n. 3, p. 461-477, Mar 2007.

A espécie humana utiliza uma fração muito pequena das plantas. O reino vegetal ainda permanece como uma grande incógnita cujos mistérios começam a ser desvendados (Pinto *et al.*, 2002). Nesse sentido, a pesquisa com plantas medicinais ainda contribuirão enormemente para a descoberta e desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de diversas patologias, para o desenvolvimento de novas ferramentas experimentais, para a elucidação de novos ligantes de receptores até então órfãos e para a elucidação de fenômenos celulares e moleculares e, dessa

forma, abrir novas oportunidades para o desenvolvimento de novas terapias. Para tanto, é de vital importância que sejam realizados estudos no intuito de estabelecer possíveis propriedades farmacológicas e toxicológicas dos mais diversos gêneros e espécies de plantas utilizadas na medicina popular brasileira, subsidiando, assim, o emprego dos extratos ou frações dessas plantas como fitofármacos e também no intuito de isolar novos metabólitos secundários biologicamente ativos que possam ser aplicados futuramente na prática clínica ou em pesquisas.

1.2 Família *Asteraceae*

G. polymorpha pertence à família *Asteraceae*. A família *Asteraceae* (*Compositae*) consiste na maior família das angiospermas, compreendida por mais de 1.100 gêneros e cerca de 25.000 espécies. As plantas da família *Asteraceae* são, em grande parte, espécies herbáceas. Plantas dessa família são extensivamente estudadas quanto à sua composição química e atividade biológica, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos, inseticidas, entre outros (Verdi *et al.*, 2005)

1.3. *G. polymorpha*

O gênero *Gochnatia* (tribo Mutisieae, subtribo Gochnatiinae) é formado por árvores ou arbustos (Cabrera e Klein, 1973). Este gênero possui cerca de 70 espécies, sendo a maioria encontrada no continente americano (México a Argentina) e apenas 2 ocorrem em países asiáticos como China, Índia, Nepal, Paquistão e no sudeste da Ásia. No Brasil são encontradas 22 espécies distribuídas nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Goiás, Minas Gerais, Bahia e Ceará. Na região Sul do Brasil (Paraná ao Rio Grande do Sul) ocorrem 6 espécies: *G. argyrea* (Dusén ex Malme) Cabr.; *G. ramboi* Cabr.; *G. orbiculata* (Malme) Cabr.; *G. sordida* (Less) Cabr.; *G. polymorpha* (Less) Cabr.; e *G. velutina* (Bong.) Cabr. (Katinas *et al.*, 2008).

Poucos trabalhos fitoquímicos envolvendo o gênero *Gochnatia* foram realizados. Apenas 14 espécies foram estudadas, das quais foram isoladas 144 substâncias de diversas classes de compostos: 53 lactonas sesquiterpênicas, 10 lactonas diméricas, 13 sesquiterpenos, 13 diterpenos, 21 triterpenos, 20 flavonóides, 7 cumarinas e 7 substâncias de outras classes, sendo 3 compostos fenólicos, 1 composto acetilênico, 1 terpenóide, 1 lignana e 1 aminoácido (Strapasson, 2010).

G. polymorpha (Less) Cabrera (conhecida inicialmente como *Moquinea polymorpha* (Less) DC), é uma árvore de médio porte, conhecida no Brasil como cambará, cambará-da-folha-grande ou cambará-do-mato (figura 2). As suas folhas, flores e cascas do tronco são utilizadas na medicina popular no preparo de chás ou xaropes para o tratamento de resfriados, tosse e outras doenças respiratórias (Mors *et al.*, 2000; Garlet e Irgang, 2001; Bueno *et al.*, 2005; Arambarri *et al.*, 2008). Três subespécies de *G. polymorpha* são reconhecidas: *polymorpha*, *floccosa* e

ceanothifolia. A subespécie *polymorpha* é encontrada no sudeste do Brasil e no Paraguai. A subespécie *ceanothifolia* ocorre nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e também no Uruguai, Paraguai e nordeste da Argentina. A subespécie *floccosa* é exclusiva do Brasil, sendo encontrado nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Cabrera e Klein, 1973; Catalan *et al.*, 2003).



FIGURA 2 – FOTO DE *Gochnatia polymorpha*. *Gochnatia. Polymorpha*, conhecida popularmente como cambará, cambará-da-folha-grande ou cambará-do-mato. FONTE: Foto disponível em <http://eptv.globo.com/terradagente/0,0,4,74%3B7,cambara.aspx>.

Estudos fitoquímicos com a espécie *G. polymorpha* evidenciaram a presença de diferentes constituintes químicos, demonstrando grande diversidade química da espécie. No primeiro estudo fitoquímico, ainda com o nome de *Mochinea polymorpha*, Farias *et. al.* (1984) isolaram uma lactona sesquiterpênica, identificada

como deidrocostuslactona, e o triterpeno pentacíclico acetato de bauerenila (Figura 3A) a partir do extrato hexânico do caule e cascas do caule de um exemplar coletado em Campinas, estado de São Paulo, de subespécie não identificada. Bohmann *et al.* (1986) isolaram uma série de sesquiterpenos com esqueletos bisabolenos e lactonas diméricas, além de duas lactonas sesquiterpênicas simples (deidrocostuslactona e costunolido), a partir das partes aéreas e raízes de um exemplar de *G. polymorpha*, subespécie não identificada, coletado no Paraguai. Outro trabalho utilizando as partes aéreas e as raízes de *G. polymorpha* subespécie *polymorpha* de um exemplar coletado no estado de São Paulo, identificou dois diterpenos, dois triterpenos, os flavonóides genkwanina e desmetoxicentaureidina, além de um eudesmanolídeo, santamarina, todos na fração em diclorometano (Sacilotto *et al.*, 1997). O estudo fitoquímico de um exemplar de *G. polymorpha*, subespécie não identificada, coletado no estado do Rio Grande do Sul, mostrou a presença dos flavonóides 3-O-metilquercetina, rutina e hiperosídeo, os ácidos caféico e clorogênico e o aminoácido 4-hidroxi-*N*-metil-prolina na fração em acetato de etila do extrato das folhas (Moreira *et al.*, 2000). Outro estudo com a subespécie *polymorpha* de outro exemplar paraguaio, mostrou a presença de um diterpeno, um triterpeno (ácido oleanólico), de três cumarinas e de um monoterpene, lolilido a partir da fração em diclorometano das folhas (Catalan *et al.*, 2003). Recentemente, Strapasson *et al.* (2010) isolaram, pela primeira vez, uma lactona sesquiterpênia identificada como 11, 13-diidrozaluzanina C (figura 3B) em um exemplar de *G. polymorpha*.

No mesmo estudo em que Moreira *et al.*, (2000) identificaram os compostos na fração em acetato de etila das folhas de *G. polymorpha*, os pesquisadores também avaliaram a atividade antiinflamatória dos extratos aquosos e alcoólico, bem como

das frações em diclorometano, acetato de etila e em butanol, e do aminoácido não protéico 4-hidróxi-*N*-metil-prolina no modelo de edema de pata induzido pela carragenina em ratos. Somente a fração em acetato de etila na dose de 150 mg/kg demonstrou atividade anti-edematogênica e foi submetida à estudos químicos subsequentes. Os compostos identificados foram os ácidos caféico e clorogênico, 3-O-metilquercetina, rutina e hiperosídeo, cujas atividades antiinflamatória já haviam sido reportadas. O aminoácido 4-hidróxi-*N*-metil-prolina, obtido do resíduo aquoso por cristalização demonstrou atividade anti-edematogênica na dose de 200 mg/kg (Moreira *et al.*, 2000).

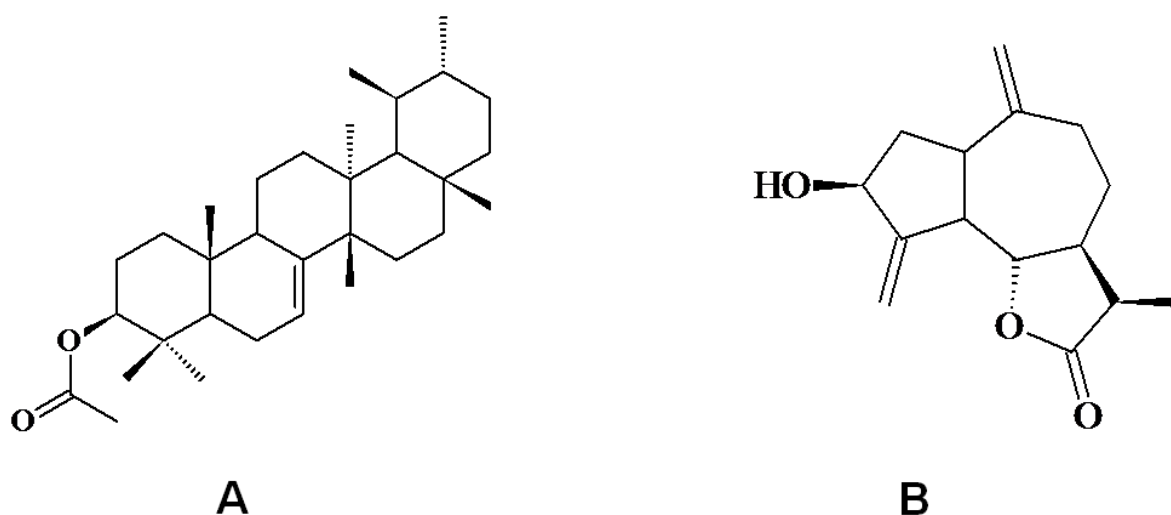


FIGURA 3. Estrutura química dos compostos acetato de bauerenila (a) e 11, 13-diidrozaluzanina (b) de *G. polymorpha* ssp *floccosa*

Com relação à subespécie *floccosa*, Stefanello *et al.* (2006). indentificaram a presença de fenilpropanóides, monoterpenos e sesquiterpenos no óleo essencial das flores e raízes da planta. O extrato e frações de várias partes de *G. polymorpha* ssp. *floccosa* foram avaliadas quanto a uma possível atividade antimicrobiana e citotóxica. O extrato das cascas mostrou-se o mais ativo, inibindo o crescimento de

quatorze bactérias e dois fungos. No mais, os extratos não demonstraram citotoxicidade no teste de letalidade contra *Artemia salina*.

Embora *G. polymorpha* seja amplamente utilizada para fins medicinais, poucos estudos foram realizados no intuito de avaliar a atividade biológica, o potencial terapêutico e toxicidade da planta, bem como, estudos biomonitorados com o objetivo de identificar e isolar compostos que, possivelmente, estariam relacionados com tal atividade. Apenas um estudo foi realizado demonstrando que *G. polymorpha* possui atividade antiinflamatória. No entanto, os pesquisadores avaliaram apenas a atividade anti-edematogênica e outros parâmetros do processo inflamatório, tal como a migração celular, não foi avaliada. Poucos estudos farmacológicos foram realizados com as subespécies *floccosa* e *ceanothifolia* até o momento. É importante, dessa forma, estudos farmacológicos que avaliem a atividade biológica e estudos químicos que possam elucidar a composição química da planta, identificar e isolar compostos que possam, posteriormente, ser ensaiados farmacologicamente e toxicologicamente no intuito de: i) validar o uso da *G. polymorpha* para fins medicinais; ii) identificar biomarcadores úteis para a padronização de extratos para a produção de fitomedicamentos; iii) identificar e isolar novos compostos químicos que possam ser utilizados como medicamentos, como protótipos para a obtenção de novos medicamentos ou novas ferramentas experimentais.

1.4 O processo inflamatório

O termo inflamação é utilizado para denotar um complexo fenômeno do organismo frente a um processo infeccioso, a um antígeno ou lesão celular ou

tecidual, de caráter salutar, com o propósito de erradicar o agente agressor e promover a reparação tecidual (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

O processo inflamatório foi descrito inicialmente por Cornelius Celsius (mais de 2.000 anos atrás) em termos dos sinais cardinais (calor, rubor, edema e dor; o quinto sinal cardinal – perda da função ou *functio lesae* – foi descrito posteriormente por Virchow). Os sinais cardinais são sinais clínicos característicos do processo inflamatório agudo (Trowbridge e Emling, 1997; Rock e Kono, 2008).

Os sinais cardinais do processo inflamatório agudo descritos por Celsius refletem, na verdade, as mudanças hemodinâmicas (ou vasculares) e celulares que ocorrem durante a inflamação. As mudanças hemodinâmicas são caracterizadas pela vasodilatação arteriolar e um aumento localizado da permeabilidade microvascular. Todas essas etapas que constituem esse o processo inflamatório (vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e migração celular) são reguladas pela ação de vários mediadores liberados durante uma lesão tecidual ou na presença de microorganismos patogênicos, alérgenos, compostos tóxicos, corpos estranhos e irritantes. Esses mediadores que orquestram o processo inflamatório são derivados de proteínas presente no plasma ou produzidos e liberados por células endoteliais, leucócitos infiltrados no sítio inflamatório ou por células residente (Medzhitov, 2008). Os eventos celulares e vasculares e os mediadores envolvidos serão descritos posteriormente.

Uma vez deflagrado, o processo inflamatório pode se resolver de maneira adequada, neutralizando e eliminando o agente agressor e restaurando o tecido afetado. O processo de resolução envolve a neutralização e eliminação do agente agressor, normalização da permeabilidade vascular, cessação da infiltração

leucocitária, apoptose dos neutrófilos presentes no sítio inflamatório e remoção dos corpos apoptóticos, corpos estranhos e debris celulares, eventos nos quais os macrófagos exercem um papel importante, reconhecendo e fagocitando os neutrófilos apoptóticos de maneira não flogística (Gilroy *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2005; Weigert *et al.*, 2009). Portanto, os processos de apoptose e fagocitose são importantes durante a fase resolutive do processo inflamatório. De fato, evidências sugerem que falhas nos processos de apoptose pode ser um fator importante na patogênese e progressão de diversas doenças (Gilroy *et al.*, 2004). A resolução da inflamação, diferente do que se imaginava antigamente, é um processo ativo e depende de vários mediadores anti-inflamatórios e pró resolutivos que são sintetizados durante o processo. Alguns mediadores envolvidos na resolução do processo inflamatório são as prostaglandinas ciclopentenonas, as lipoxinas, resolvinas, anexina I, fator nuclear kappa B (NF- κ B) e mediadores da apoptose.

Interessantemente, as mesmas enzimas ciclooxigenase (COX) e a lipooxigenase (LOX), envolvidas na síntese de mediadores inflamatórios, também são importantes e participam da biossíntese de mediadores pró-resolutivos como as resolvinas, derivadas de ácidos graxos polinsaturados (p.ex. o ácido eicosapentanóico (EPA) e lipoxinas derivadas do ácido araquidônico (AA) (Rajakariar *et al.*, 2006). Drogas baseadas em mediadores endógenos que exercem efeitos pró-resolutivos podem representar uma nova estratégia para a terapia antiinflamatória (Gilroy *et al.*, 2004; Serhan *et al.*, 2007).

Entretanto, o processo inflamatório pode seguir outro curso que não a resolução e resultar em fibrose (substituição por tecido conectivo) ou progredir para um processo inflamatório crônico como resultado da persistência do agente agressor (infecções persistentes por certos microorganismos; exposição prolongada a

agentes potencialmente tóxicos ou reações autoimunes) ou falhas nos processos de resolução (Kumar *et al.*, 2005).

1.4.1 Vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular

As vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular se desenvolvem rapidamente, dentro de segundos, após um estímulo inflamatório agudo. Em algumas ocasiões, uma rápida e transitória vasoconstrição pode anteceder a vasodilatação. A vasodilatação arteriolar mediada principalmente pela histamina, prostaglandinas e óxido nítrico, resulta em um aumento do fluxo sanguíneo, o que explica os sinais de calor e rubor. O aumento do fluxo sanguíneo e o aumento da permeabilidade microvascular juntos resulta numa redução da velocidade do fluxo sanguíneo e na exsudação de plasma rico em proteínas para o espaço extravascular. A redução da pressão osmótica intravascular e aumento da pressão osmótica extravascular decorrente do extravasamento plasmático, somado a pressão hidrostática aumentada devido à vasodilatação, induz a saída e acúmulo de fluido no interstício explicando o desenvolvimento do edema durante a inflamação aguda (Kumar *et al.*, 2005; Lichtman e Williams, 2006). O aumento da permeabilidade vascular é mediado por várias substâncias geradas durante o processo inflamatório. O mecanismo mais comum pelo qual esses mediadores promovem o aumento da permeabilidade vascular é através da contração das células endoteliais que revestem as vênulas pós-capilares. Quando as células endoteliais se contraem as junções intercelulares se desfazem, permitindo o extravasamento plasmático. Outros mecanismos envolvidos no aumento da permeabilidade vascular inclui a retração das células endoteliais com envolvimento

do citoesqueleto, lesões das células endoteliais mediadas por leucócitos, lesão endotelial direta, extravasamento através de novos capilares (capilares em regeneração) cujas junções intercelulares não estejam fechadas e por transcitose (Lichtman e Williams, 2006; Mehta e Malik, 2006).

1.4.2 Migração celular

Os leucócitos são os principais efetores, responsáveis pela fagocitose e eliminação de agentes invasores/agressores e debris celulares durante a inflamação. Portanto, a migração dos leucócitos, antes restritos ao lúmen dos vasos, para o espaço extravascular e subsequentemente para o foco inflamatório é um evento fundamental para uma resposta inflamatória. Essas células fagocíticas são responsáveis por conter e destruir microorganismos patogênicos através da fagocitose e liberação de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enzimas proteolíticas presente em seus grânulos. No entanto, essas substâncias não são específicas a ponto de destruir somente o agente agressor e também promovem danos teciduais. Isto é, embora os leucócitos sejam críticos para a defesa do hospedeiro, eles são os efetores primários da inflamação e respostas imunes. Durante o processo de transmigração da corrente sanguínea para o espaço extravascular, os leucócitos podem lesionar a parede dos vasos, provocando trombose ou promovendo edema. Os leucócitos emigrados podem iniciar e sustentar o dano tecidual através da liberação de diversos mediadores, como oxidantes, proteases, lipídios bioativos e citocinas (Yonekawa e Harlan, 2005). Doenças genéticas ou adquiridas que, de certa forma, impedem que os leucócitos migrem para o foco inflamatório ou que exerçam suas tarefas, aumentam a vulnerabilidade

a infecções mostrando, a importância dessas células na defesa do organismo (Cotran e Mayadas-Norton, 1998; Ley e Reutershan, 2006). O processo de migração celular para o foco inflamatório segue os estágios de marginação, rolagem, firme adesão (ainda no interior dos vasos) a migração dos leucócitos do espaço intravascular para o interstício, processo conhecido também como diapedese e finalmente a migração para o sítio inflamatório (Kumar *et al.*, 2005; Lichtman e Williams, 2006; Langer e Chavakis, 2009)

Em decorrência das alterações vasculares, as células sanguíneas deixam a posição axial no interior dos vasos e assumem uma posição marginal, isto é, passam a circular mais próximas do endotélio vascular. Esse evento é chamado de marginação. Durante o processo inflamatório as células endoteliais que revestem os vasos são ativadas por diversos mediadores inflamatórios (histamina, trombina, fator ativador de plaquetas (PAF) e citocinas) e expressam várias moléculas de adesão que se ligam a moléculas complementares expressas na membrana celular dos leucócitos promovendo a rolagem e posteriormente a firme adesão dos leucócitos às células do endotélio. Estes eventos precedem o processo de transmigração, no qual os leucócitos emitem pseudopodos por dentre as células endoteliais (por meio das junções intercelulares) e se projetam para o outro lado. Esses eventos celulares (rolagem, adesão e migração) são governados por proteínas expressas na membrana celular endotelial e também nos leucócitos, conhecidas como moléculas de adesão. A expressão dessas moléculas de adesão é regulada pelos vários mediadores inflamatórios (Cotran e Mayadas-Norton, 1998; Ley e Reutershan, 2006; Pober e Sessa, 2007; Langer e Chavakis, 2009)

As moléculas de adesão compreendem três famílias moleculares: as selectinas, as imunoglobulinas e as integrinas. A família das selectinas é composta

pelas glicoproteínas E-selectina (expressa somente em células endoteliais), P-selectinas (expressas em células endoteliais e plaquetas) e L-selectina (expressa em leucócitos) responsáveis por adesões de rolamento reversíveis e de baixa afinidade. A família das imunoglobulinas enquadra duas moléculas de adesão endotelial, a ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1) e a VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular 1). Ambas (ICAM-1 e VCAM-1) interagem com as integrinas, que são glicoproteínas heterodiméricas encontradas nos leucócitos, responsáveis pela promoção da firme adesão entre os leucócitos e endotélio. A PECAM-1 (molécula de adesão plaqueta /endotélio) é outra molécula de adesão da família das imunoglobulinas importante. A PECAM-1 é expressa na membrana lateral das células endoteliais e cumpre funções importantes durante a diapedese (Petri e Bixel, 2006; Langer e Chavakis, 2009). As integrinas, proteínas heterodiméricas, são compostas de duas cadeias, uma beta e uma alfa. As β 2-integrinas são as mais amplamente estudadas e entendidas. Essas moléculas são compostas de distintas subunidades alfa (CD11a, CD11b, CD11c) ligadas a uma subunidade beta comum (CD18). Essas moléculas expressas na superfície dos neutrófilos, interagem com ligantes, particularmente com ICAM-1 presente na membrana das células endoteliais para promover a adesão (Granger e Kubes, 1994; Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

As P-selectinas estão presentes na membrana de grânulos intracitoplasmáticos endoteliais chamados corpos de Weibel-Palade. Por ação de mediadores como histamina, trombina e PAF, as P-selectinas são rapidamente redistribuídas para a superfície celular, onde elas podem se ligar às suas moléculas receptoras nos leucócitos (Langer e Chavakis, 2009). A expressão das moléculas de adesão (E-selectina, ICAM-1, VCAM-1) é aumentada na vigência de um processo inflamatório. Mediadores inflamatórios, e particularmente as citocinas (TNF- α e IL-1) induzem a

síntese e a expressão das moléculas de adesão na superfície das células endoteliais. As integrinas são expressas normalmente nos leucócitos, porém, não se ligam às moléculas de adesão endoteliais. Agentes quimiotáticos ou outros estímulos, promovem um aumento da avidéz de ligação das integrinas que, juntamente com o aumento da expressão da ICAM-1 são etapas essenciais para a adesão entre os leucócitos e as células endoteliais (Kumar *et al.*, 2005)

As integrinas leucocitárias são alvos terapêuticos, uma vez que essas proteínas participam de processos inflamatórios e imunes. Estudos pré-clínicos e clínicos mostram a efetividade do bloqueio de integrinas leucocitárias em diversas patologias como asma, esclerose múltipla, psoríase, doenças inflamatórias intestinais como a doença de Chron e colite ulcerativa (Yonekawa e Harlan, 2005). Na verdade, terapias capazes de alterar e/ou bloquear de forma seletiva a migração celular, seja inibidores das selectinas, integrinas ou antagonistas dos receptores de quimioatraentes, representam uma classe particularmente promissora de novas drogas antiinflamatórias. (Mackay, 2008).

1.4.3 Mediadores do processo inflamatório

De acordo com as propriedades bioquímicas, os mediadores do processo inflamatório podem ser divididos em: aminas vasoativas (histamina e serotonina); peptídeos vasoativos (substância P, trombina, bradicinina); fragmentos do sistema complemento (C3a, C4a e C5a, também conhecido como anafilatoxina); mediadores lipídicos (eicosanóides, PAF), citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6 e várias outras); quimiocinas (p. ex. IL-8) e as enzimas proteolíticas como a elastina, catepsina e metaloproteinases

Aminas Vasoativas

As aminas vasoativas (histamina e serotonina) como o nome implica, são aminas com ação sobre a vasculatura. Esses mediadores encontram-se armazenados em grânulos citoplasmáticos. A histamina é uma amina vasoativa presente principalmente nos mastócitos, enquanto que a serotonina está presente nas células enterocromafins e nas plaquetas, principalmente. Vários fatores induzem a liberação desses mediadores de suas fontes, incluindo trauma, frio, reações imunes, anafilatoxinas, substância P, citocinas (promovem liberação de histamina) e agregação plaquetária após contato com colágeno, trombina, adenosina difosfato, complexos imunes, PAF (promovem liberação de serotonina das plaquetas). Ou seja, vários fatores químicos e físicos podem promover a liberação desses mediadores. A liberação localizada de histamina e sua ação principalmente nos receptores H_1 na microcirculação promove vasodilatação das arteríolas e aumento da permeabilidade vascular, promove também a síntese de prostaciclina e induz a liberação de óxido nítrico pelo endotélio. O aumento da permeabilidade vascular ocorre por meio da contração das células endoteliais e subsequente formação de abertura das junções celulares endoteliais, resultando no extravasamento plasmático. A serotonina ou 5-hidroxitriptamina promove vasodilatação dependente de óxido nítrico e aumento da permeabilidade vascular (Kumar *et al.*, 2005; Jutel *et al.*, 2009).

Peptídeos vasoativos e fragmentos do complemento

Os peptídeos vasoativos podem estar armazenados em vesículas secretórias (p. ex. substância P) ou podem ser gerados através de processos proteolíticos a partir de precursores inativos presente no plasma (p. ex. bradicinina). A substância P é liberada por neurônios sensoriais e podem causar degranulação mastocitária

liberando histamina. Outros peptídeos vasoativos podem causar vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular diretamente, ou através da liberação de histamina. A bradicinina é um peptídeo vasoativo composto por nove aminoácidos (nonapeptídeo) gerado a partir da clivagem proteolítica do cininogênio (precursor inativo) por ação da enzima calicreína, com envolvimento do fator de Hageman (fator XII da via intrínseca da coagulação), que é ativado pelo contato com colágeno e membrana basal. O fator XII ativado produz o fragmento XIIa que converte a pré-calicreína em sua forma ativa (proteolítica), a calicreína. A bradicinina afeta a vasculatura promovendo dilatação de vasos sanguíneos e aumento da permeabilidade vascular. A bradicina tem um papel importante também na dor (um dos sinais cardinais da inflamação), pois, possui um potente efeito algésico. Os fragmentos C3a, C4a e principalmente o fragmento C5a (também conhecido com anafilatoxinas) gerado pela ativação do sistema complemento promovem degranulação dos mastócitos afetando, desse modo, a vasculatura e, além disso são quimiotáticos, participando na migração dos granulócitos (neutrófilos, eosinófilos) e monócitos durante a inflamação (Kumar *et al.*, 2005; Haas e Van Strijp, 2007; Kuhr *et al.*, 2010).

Mediadores lipídicos (eicosanóides)

Outra classe de mediadores envolvidos no processo inflamatório são os mediadores lipídicos. Os mediadores lipídicos conhecidos genericamente como eicosanóides compreendem os prostanóides, leucotrienos (LTs) e lipoxinas derivados do metabolismo do ácido araquidônico (AA). O AA é um ácido graxo poliinsaturado contendo 20 carbonos presente, normalmente, esterificado nos fosfolipídios que compõe a membrana celular. O AA é liberado dos fosfolipídeos da membrana celular por ação principalmente da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) que é

ativada por diversos estímulos químicos, físicos e mecânicos ou por outros mediadores (p. ex. C5a). Uma vez liberado o AA é metabolizado por duas principais vias enzimáticas, a via da ciclooxygenase (COX-1 e COX-2) e a via da lipooxygenase (5-LOX, 12-LOX e 15-LOX) ou também através da via P450 epoxigenase. Os produtos da via da COX são os prostanóides (PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 e TXA_4) enquanto os produtos da via da LOX, são os leucotrienos (LTA_4 , LTB_4 , LTC_4 , LTD_4) e lipoxinas. Os prostanóides podem ser gerados por duas isoformas enzimáticas, a COX-1 e COX-2. A COX-1, é expressa constitutivamente em vários tecidos produzindo PGs em baixos níveis e contribui para a manutenção das funções fisiológicas. Por outro lado, a COX-2, também conhecida como induzível, como o nome implica, tem sua expressão altamente induzida em resposta a estímulos pró-inflamatórios, citocinas, e mitógenos e, por isso, a biossíntese de PGs durante processos inflamatórios é creditado à COX-2. Entretanto, a COX-2 também é expressa constitutivamente em algumas regiões cerebrais e também no aparato justa glomerular renal e endotélio vascular. Essas duas enzimas (PGH sintase) catalizam inicialmente a conversão do AA em PGG_2 e depois em PGH_2 que é subsequentemente convertido nos prostanóides biologicamente ativos (PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 e TXA_4). Os eicosanóides afetam várias funções na microcirculação, incluindo coagulação, fibrinólise, reatividade e controle do fluxo sanguíneo vascular, permeabilidade, adesão e migração leucocitária e controle local da função das células do sistema imunológico. De interesse, os eicosanóides em conjunto com outros mediadores, participam das mudanças hemodinâmicas e migração celular durante o processo inflamatório. A PGE_2 e PGI_2 promovem vasodilatação aumentando o fluxo sanguíneo na microvasculatura. Além disso, potencializam o aumento da permeabilidade vascular e os efeitos quimiotáticos de outros

mediadores. A PGE_2 está envolvida no desenvolvimento da febre e dor durante a inflamação. Essa PG sensibiliza os neurônios aferentes primários tornando-os mais responsivos ou sensíveis a estímulos algícos como a bradicinina. Os cisteinil leucotrienos, compreendidos pelo LTC_4 , LTD_4 e LTE_4 causam intensa vasoconstrição e aumento da permeabilidade vascular em regiões venulares. O LTB_4 é um potente mediador quimiotático promovendo adesão e migração de leucócitos. O TXA_4 produz vasoconstrição e promoção da agregação plaquetária (Gerritsen, 1996; Rajakariar *et al.*, 2006; Harizi *et al.*, 2008).

Citocinas e quimiocinas

Um grupo de polipeptídeos produzidos por vários tipos celulares, principalmente por macrófagos e linfócitos ativados conhecido como citocinas são importantes mediadores do processo inflamatório. As citocinas são pleiotrópicas e modulam a função de muitos tipos celulares e são determinantes para a infiltração celular e para os efeitos sistêmicos durante o processo inflamatório agudo. As principais citocinas que medeiam a resposta inflamatória aguda são o $\text{TNF-}\alpha$, IL-1, IL-6 e a quimiocina IL-8, dentre outras. A secreção das citocinas é estimulada por endotoxinas, complexos imunes, toxinas, lesões físicas, e uma variedade de processos inflamatórios. Esses polipeptídeos, uma vez liberados, exercem efeitos autócrinos (atuam na mesma célula que secretou a citocina), parácrinos (afetando células vizinhas) e endócrinos (promovendo efeitos sistêmicos, assim como os hormônios). As principais ações do $\text{TNF-}\alpha$ e IL-1- β são ativação das células endoteliais, dos leucócitos e indução de reações sistêmicas de fase aguda. No endotélio vascular ocorre um aumento na expressão e síntese de moléculas de adesão endotelial, aumentando a aderência dos leucócitos circulantes às células

endoteliais, e também a síntese e liberação de outras citocinas, fatores de crescimento, eicosanóides e óxido nítrico. As respostas de fase aguda incluem febre, sonolência, diminuição do apetite, aumento da síntese de proteínas de fase aguda, principalmente nos hepatócitos e neutrofilia (Feghali e Wright, 1997; Pober e Sessa, 2007; Dinarello, 2009; Sims e Smith, 2010).

As respostas biológicas decorrentes da ação do TNF- α e IL-1 em seus respectivos receptores envolve, tipicamente, vias de sinalização intracelulares que ativam fatores de transcrição celular como o NF-kB e AP-1 que, uma vez ativados, modulam a transcrição gênica de várias proteínas pró-inflamatórias, inclusive a transcrição dos genes que codificam o TNF- α e IL-1 β . A via das MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) representada por três principais vias (ERK1/2, JNK e p38) também é ativada durante o processo inflamatório. As proteínas quinases ERK1/2, JNK e p38 quando ativadas fosforilam outras proteínas *downstream*, incluindo fatores de transcrição e, dessa forma, também regulam a transcrição de genes inflamatórios (Rothwarf e Karin, 1999; Kaminska, 2005).

1.4.4 O fator de transcrição NF-kB

O NF-kB (fator nuclear -kB) é uma proteína constituída de duas subunidades protéicas (p65 e p50) na forma de homo ou heterodímeros presente no citoplasma celular ligado à proteína I κ B, cuja função é manter o NF-kB no citoplasma na forma inativa, impedindo a translocação desse fator de transcrição para o núcleo celular, onde exerceria seu papel de modular (induzir ou reprimir) a transcrição de inúmeros genes (Rothwarf e Karin, 1999; Wong e Tergaonkar, 2009).

Diversos estímulos, incluindo produtos microbianos como o lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular de bactérias gram-negativas e vários outros ligantes dos receptores do tipo *toll-like receptors* (TLR), citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1 β), produtos virais, dentre outros, são capazes de ativar o fator de transcrição NF-kB. A via de sinalização para a ativação do NF-kB envolve a ativação da proteína IKK (I κ B quinase), uma serina/treonina quinase. A IKK, uma vez ativada, fosforila a proteína I κ B que, subsequente, sofre ubiquitinação e, finalmente, degradação pelo proteossoma. Livre do I κ B, o NF-kB migra para o núcleo celular e se liga a sítios de ligação específicos na molécula de DNA e modula a transcrição de vários genes. Essa via de sinalização, também conhecida como via canônica do NF-kB exerce funções importantes em respostas inflamatórias. A expressão gênica de inúmeros genes que codificam proteínas pró-inflamatórias são aumentadas pela ativação do NF-kB, incluindo as enzimas óxido nítrico sintetase (iNOS), COX-2 e PLA2, várias citocinas e quimiocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, e outras), fatores de crescimento (GM-CSF, VEGF, e outros), moléculas de adesão celular (ICAM-1, VCAM-1, E-selectinas), proteínas reguladoras da apoptose (Bcl-2, Bcl-xL, cIAPs), outros fatores de transcrição, metaloproteinases e várias outras proteínas importantes para o desenvolvimento do processo inflamatório. O NF-kB também é importante em várias outras funções como regulação do sistema imune, maturação das células imunológicas, etc. (Rothwarf e Karin, 1999; Ghosh e Karin, 2002; Hayden *et al.*, 2006; Kawai e Akira, 2007; Wong e Tergaonkar, 2009)

1.4.5 Fármacos antiinflamatórios

Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), incluindo o ácido acetilsalicílico constituem o principal grupo de fármacos utilizados no tratamento da inflamação e são, também, um dos principais grupos de drogas utilizadas no mundo. Os AINEs compreendem um grande número de drogas estruturalmente heterogêneas. Os AINEs são amplamente utilizados devido aos seus efeitos antiinflamatório, antipirético e analgésico atribuídos à inibição das enzimas COX-1 e COX-2 e, por conseguinte, inibição da síntese dos prostanóides (Marnett, 2009). A inibição da síntese de prostanóides como mecanismo de ação dos AINEs foi inicialmente reportada por John R. Vane em 1971. São utilizados no tratamento de condições inflamatórias como osteoartrite, artrite reumatóide, espondiloartropatias soronegativas (p.ex. artrite psoriática e artrite relacionada à doença intestinal inflamatória), síndromes musculoesqueléticas localizadas (p.ex. entorses e distensões, dor lombar) e gota. São empregados para o alívio da dor, principalmente relacionada à inflamação, dor pós operatória, dental, etc. Alguns membros da classe dos AINEs não seletivos incluem a aspirina, o diclofenaco, a nimesulida, a indometacina, o ibuprofeno, o naproxeno, e vários outros. O ácido acetilsalicílico, um inibidor irreversível da COX-1 é também indicado, em baixas doses, na terapia antitrombótica por inibir de forma irreversível a síntese de TXA₄ pelas plaquetas. Os efeitos colaterais associados a AINEs incluem os efeitos gastrintestinais, pois, as PG exercem uma função protetora sobre a mucosa gástrica; alteração na função renal quando do uso a longo prazo em pessoas com predisposição, asma induzida por AINEs, alteração no tempo de coagulação, hipersensibilidade dentre outros. A descoberta de outra isoforma da COX (a COX-2) altamente expressa em locais inflamatórios e a noção de que os eicosanóides produzidos durante o processo inflamatório resultavam da expressão aumentada da COX-2, alavancaram esforços

em busca de novos fármacos inibidores seletivos dessa isoforma. Os inibidores seletivos de COX-2 também denominados coxibes foram desenvolvidos na tentativa de inibir a síntese de PG pela enzima COX-2 em locais de inflamação sem, contudo, afetar a ação da isoenzima COX-1 constitutivamente ativa, encontrada no trato gastrointestinal, nos rins e plaquetas. No entanto, hoje se sabe que a COX-2 também é expressa constitutivamente e exerce papéis fisiológicos através da síntese de PGI_2 . Embora os fármacos que inibem seletivamente a COX-2, demonstrem uma melhor segurança gastrintestinal, alguns membros dessa classe foram retirados do mercado devido a um risco aumentado de eventos cardiovasculares. Assim como os AINEs tradicionais, os coxibes também exercem efeitos tóxicos renais e não são recomendados para pacientes com insuficiência renal grave. Celecoxibe, Parecoxibe, Rofecoxibe, etoricoxibe e lumiracoxibe são alguns dos membros dessa classe (Katzung, 2004; Goodman *et al.*, 2006; Rainsford, 2007).

Os glicocorticóides ou antiinflamatórios esteroidais, ou hormonais, são amplamente utilizados no tratamento de distúrbios inflamatórios, alérgicos, hematológicos entre outros. Os glicocorticóides são substâncias imunossupressoras e antiinflamatórias potentes, eficazes e amplamente utilizadas em processos inflamatórios agudos e crônicos (Perretti e Ahluwalia, 2000). Os efeitos dos glicocorticóides são mediados, em sua maioria, por receptores de glicocorticóides (GR) amplamente distribuídos, pertencentes à superfamília dos receptores nucleares. Evidências sugerem que o GR suprime a inflamação por três mecanismos: efeitos genômicos diretos e indiretos e não genômicos (Katzung, 2004; Rhen e Cidlowski, 2005). O complexo GR-glicocorticóide interage com regiões promotoras de genes alvos e regulam sua transcrição. Na ausência do ligante

hormonal, o GR encontra-se principalmente no citoplasma em complexos oligoméricos com proteínas do choque térmico (Hsp). A ligação do ligante ao receptor permite a dissociação do receptor das Hsp. Posteriormente o complexo ligante-receptor é transportado para o núcleo, onde interage com o DNA e proteínas nucleares. No núcleo, o complexo se liga como homodímeros à seqüências de DNA conhecidos como elementos de resposta dos glicocorticóides (GRE). O complexo resultante recruta proteínas co-ativadoras ou co-repressoras que modificam a estrutura da cromatina, facilitando ou inibindo o início da transcrição gênica pela RNA polimerase II (Hebbar e Archer, 2003). O complexo ligante-receptor também pode interagir com outros fatores de transcrição, como AP-1 e NF-kB e, assim, regular outros genes (Mckay e Cidlowski, 1999; De Bosscher *et al.*, 2003). Os glicocorticóides podem agir também por mecanismo não genômicos, através de receptores na membrana celular e segundos mensageiros. A ativação da NOS endotelial via PI3K-Akt-eNOS e também a liberação da anexina-I, são mecanismos não genômicos dos glicocorticóides (Rhen e Cidlowski, 2005).

Os glicocorticóides ativam e induzem a transcrição da proteína anexina I, que interage e inibe a PLA₂; induz a transcrição da MAPK fosfatase, que defosforila as MAPK (JNK, ERK1/2, p38) inibindo a cascata e conseqüentemente também bloqueia a ação da PLA₂; os glicocorticóides também suprimem a expressão de COX-2. Todos esse três mecanismos independentes resultam na redução da síntese de prostaglandinas pelos glicocorticóides. Os glicocorticóides também interagem com os fatores c-Jun (c-jun homodímeros e c-Jun-Fos heterodímeros) interferindo na transcrição gênica de citocinas, receptores de citocinas, proteínas quimiotáticas, collagenases, metaloproteinases, e moléculas de adesão. O bloqueio da atividade transcricional do NF-kB pelos glicocorticóides também inibe a síntese de citocinas,

receptores de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, COX-2, iNOS e outras proteínas envolvidas em respostas inflamatórias (De Bosscher *et al.*, 2003; Rhen e Cidlowski, 2005).

A eficácia dos glicocorticóides em aliviar desordens inflamatórias resulta dos efeitos pleiotrópicos do receptor de glicocorticóide. No entanto, esses efeitos pleiotrópicos promovem diversos efeitos adversos como retardo do crescimento em crianças, imunossupressão, hipertensão, inibição da cicatrização, osteoporose e distúrbios metabólicos. Esses efeitos adversos limitam a terapia prolongada com glicocorticóides (Katzung, 2004; Rhen e Cidlowski, 2005; Goodman *et al.*, 2006).

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

G. polymorpha é utilizada na medicina tradicional para o tratamento de condições inflamatórias. Embora *G. polymorpha* seja bem conhecida na medicina tradicional quanto às suas atividades antiinflamatórias, principalmente em afecções das vias aéreas, poucos estudos científicos sustentam o uso etnofarmacológico e demonstram atividade antiinflamatória da planta. Dessa forma, esse trabalho visa avaliar a atividade antiinflamatória do extrato etanólico de *G. polymorpha* (EEGP), bem como, das frações e compostos isolados por meio de biomonitoramento, em modelos de inflamação em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito antiinflamatório do EEGP no modelo de bolsa de ar em camundongos, analisando seu efeito sobre extravasamento plasmático e migração de leucócitos que ocorrem após o estímulo inflamatório com carragenina (Cg).

Avaliar o efeito antiedematogênico do EEGP no modelo de edema de pata induzido pela Cg em camundongos.

Realizar um fracionamento guiado por bioensaios do EEGP no intuito de obter frações e compostos com atividade antiinflamatória nos modelos de inflamação na bolsa de ar e edema de pata, ambos induzidos pela Cg.

Isolar e identificar o(s) composto(s) possivelmente responsáveis pela atividade antiinflamatória do EEGP e frações e determinar sua(s) atividade(s) antiinflamatórias nos mesmos modelos animais de inflamação.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Estudos fitoquímicos

3.1.1 Material botânico – coleta e identificação

O exemplar (cascas do tronco) de *G. polymorpha* ssp. *floccosa* foi coletado na cidade de Curitiba, PR. A planta foi identificada pelo prof. Dr. Armando Carlos Cervi, do Departamento de Botânica da UFPR. Uma exsicata foi depositada no herbário da mesma instituição (UPCB) sob o número 30100.

A preparação dos extratos, os fracionamentos e isolamento dos compostos, bem como as caracterizações químicas dos compostos foram realizadas pela professora Maria Élide Alves Stefanello e pela aluna Regiane Lauriano Batista Strapasson, do departamento de Química, UFPR.

3.1.2 Preparação do extrato e frações

O material botânico (cascas do tronco da *G. polymorpha* ssp. *floccosa*) após os processos de secagem e moagem, foi submetido à extração em temperatura ambiente (maceração) com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano e etanol), com renovação em intervalo de 24 horas. O volume de solvente foi de 500 mL para cada 100 g de material. As soluções obtidas foram concentradas em evaporador rotativo à pressão reduzida, rendendo os extratos em hexano e EtOH. Os resíduos vegetais foram descartados. O extrato em EtOH foi dissolvido em EtOH-H₂O (1:1) e submetido à partição seqüencial com CH₂Cl₂, AcOEt e 1-butanol, rendendo as respectivas frações (figura 4). A fração em CH₂Cl₂ foi submetida ao

fracionamento em coluna rápida, rendendo as frações em EP, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH (figura 5).

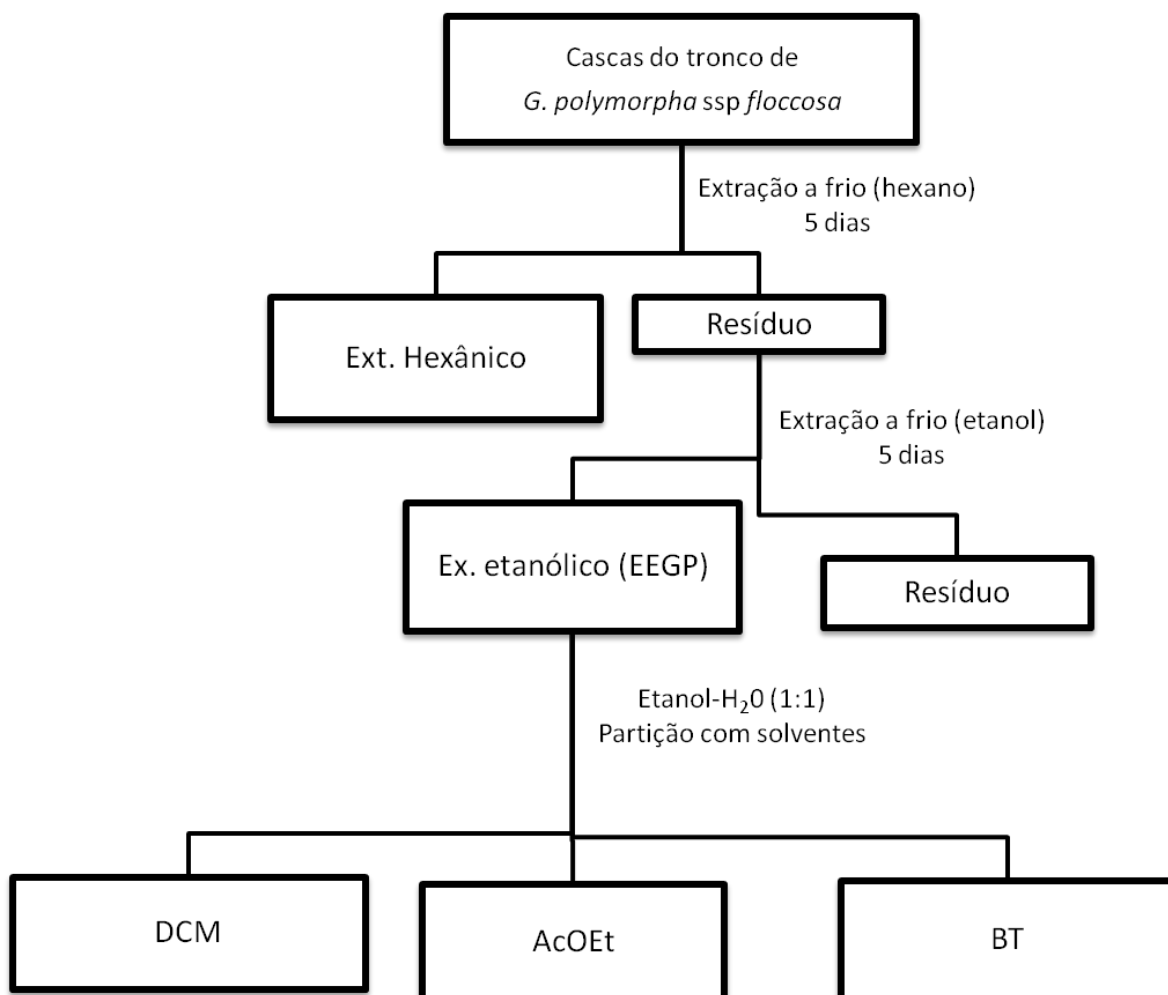


FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DEMONSTRATIVO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DO MATERIAL BOTÂNICO. O resíduo da extração em hexano das cascas do tronco de *G. polymorpha ssp floccosa* foi extraído a frio com etanol. O extrato etanólico, por sua vez, foi submetido a uma partição com solventes de diferentes polaridades originando as frações DCM, AcOEt e BT. EEGP, extrato etanólico de *G. polymorpha*; DCM, diclorometano; AcOEt, acetato de etila; BT, butanólico.

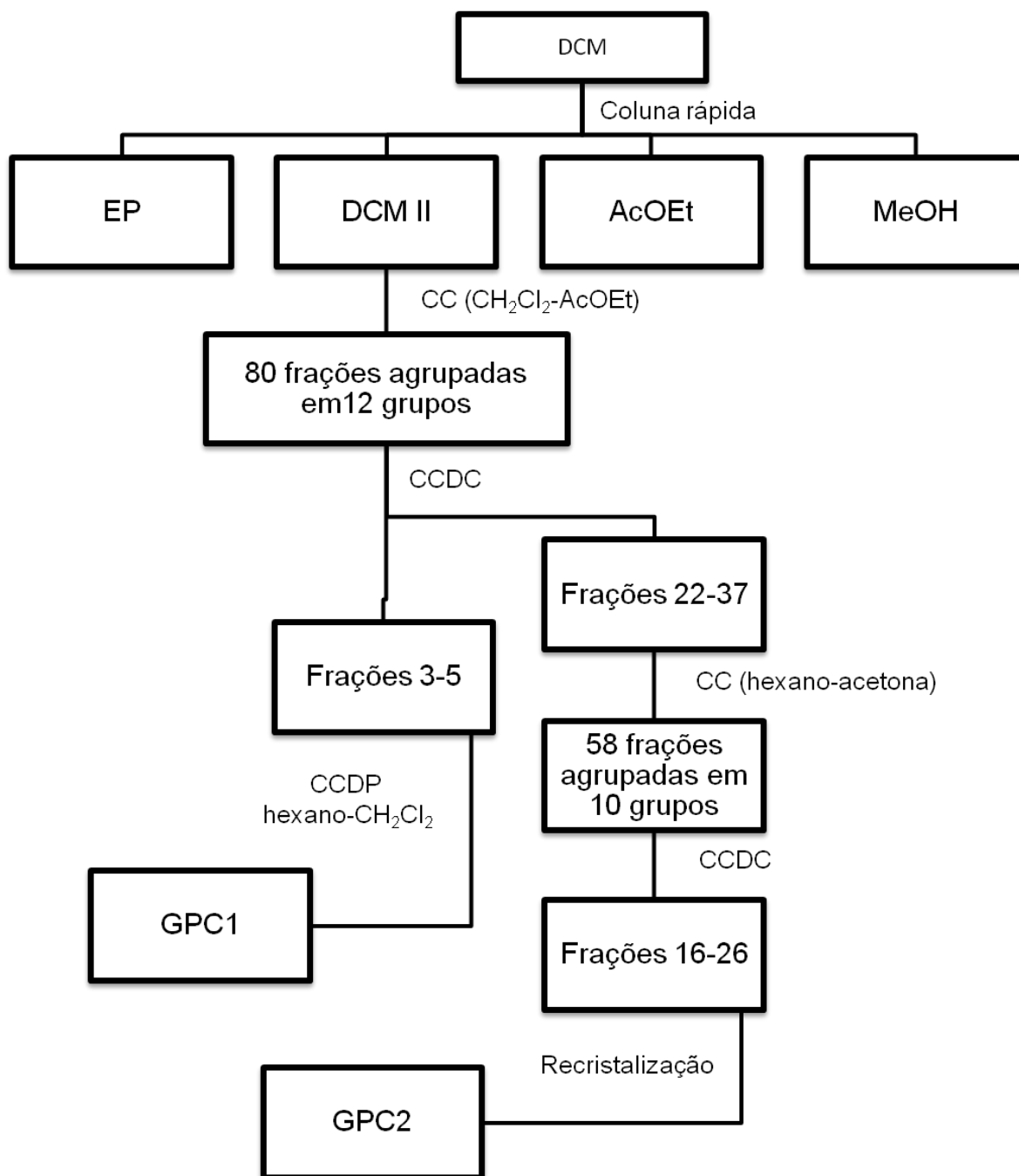


FIGURA 5 – FLUXOGRAMA RESUMIDO DO PROCESSO DE FRACIONAMENTO E OBTENÇÃO DOS COMPOSTOS A PARTIR DA FRAÇÃO DCM. A fração DCM foi fracionada originando as frações EP, DCM II, AcOEt e MeOH. A fração DCM II foi posteriormente submetida a CC originando 80 frações que foram agrupadas em 12 grupos. A fração 3-5 foi submetida à CCDP rendendo o composto GPC1. Parte da fração 16-26 foi recristalizada em hexano e CH₂Cl₂ rendendo o composto GPC2. DCM, diclorometano; EP, éter de petróleo; AcOEt, acetato de etila; MeOH, metanol; CC, cromatografia em coluna; CCDC, cromatografia em camada delgada comparativa; CCDP, cromatografia em camada delgada preparativa.

3.1.3 Isolamento e identificação dos compostos a partir da fração em CH₂Cl₂

A fração em CH₂Cl₂ foi submetida à cromatografia em coluna, eluída inicialmente com gradiente de AcOEt em CH₂Cl₂, e posteriormente um gradiente de MeOH em AcOEt. Foram recolhidas 80 frações de aproximadamente 5 mL, as quais foram agrupadas em doze (1-2; 3-5; 6; 7-16; 17-20; 21; 22-37; 38-40; 41-49; 50-66; 67-74; e 75-80). As frações foram agrupadas por semelhança após análise por CCDC. A fração 3-5 foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa, eluída três vezes com hexano- CH₂Cl₂ 1:1, rendendo o composto GPC1 com rendimento de aproximadamente 0,13%. A fração 22-37 foi submetida à cromatografia em coluna, eluída com hexano-acetona nas proporções 8:2, 7:3, 1:1 e 3:7. Foram recolhidas 58 frações de aproximadamente 5 mL, as quais foram agrupadas em dez (1-3; 4-6; 7-15; 16-26; 27-34; 35-37; 38; 39-44; 45-50; e 51-58). A fração 16-26 continha uma substância quase pura. Parte dessa fração foi recristalizada em hexano e CH₂Cl₂, rendendo o composto GPC2 com rendimento de aproximadamente 17%.

Os compostos isolados foram identificados por meio de técnicas espectrométricas (RMN ¹H, RMN ¹³C, HSQC e HMBC) e também pela comparação com a literatura. Os espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C obtidos foram registrados em um espectrômetro Brucker, operando a 200 MHz e a 400 MHz para hidrogênio e a 100 MHz e a 50 MHz para carbono. Os espectros HSQC e HMBC foram registrados no aparelho operando a 400 MHz. Os experimentos foram conduzidos em aproximadamente 0,5 mL de clorofórmio deuterado como solvente, usando-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna e ajuste da homogeneidade do campo magnético.

3.2 Estudos farmacológicos - avaliação da atividade antiinflamatória

3.2.1 Drogas e reagentes

Carragenina foi adquirida da Sigma Co., e dexametasona (Decadronal®). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2.2 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Swiss* machos (25-35g) mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, em temperatura (22 ± 2 °C) e umidade controlada (60-80%), ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratório e considerações éticas com os protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná, sob o número 336.

3.2.3 Modelo de inflamação na bolsa de ar

O modelo de inflamação na bolsa de ar foi realizado de acordo com Garcia-Ramallo *et. al.* (2002), porém, com algumas adaptações. No dia 0, os animais receberam uma injeção subcutânea de 4 mL de ar estéril no dorso. No dia 3, uma nova injeção de 2 mL de ar estéril dentro da bolsa pré-formada foi realizada. No dia 6, os animais foram separados em diferentes grupos: naïve (animais que não sofreram estímulo inflamatório), veículo (tween 80, concentração menor que 1%, v.o.), dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.), EEGP (30, 100 e 300 mg/kg, v.o.), DCM (50

mg/kg, v.o.), BT (20 mg/kg, v.o.) e GPC2 (10 mg/kg, v.o.). Uma hora após o tratamento, 0,25 mL de uma solução a 0,1% de carragenina em salina foi injetada no interior da cavidade, exceto no grupo naïve, o qual recebeu uma injeção de 0,25 mL de salina. Quatro horas após o estímulo inflamatório os animais foram eutanasiados e a bolsa foi lavada com 2 mL de PBS heparinizado (10 UI/mL). Com o auxílio de uma pipeta o lavado foi coletado, através de uma incisão na bolsa.

Determinação do número total de células na bolsa de ar: o número de células totais no lavado foi determinado através de contagem com o auxílio de uma câmara de Neubauer sob microscopia óptica. Uma porção do lavado foi diluído em líquido de Türk (1:20) e submetido à contagem.

Determinação do nível de proteínas no lavado: O lavado foi centrifugado (1.000 g por 15 minutos a 4°C) e o sobrenadante foi utilizado. O nível protéico no lavado foi avaliado através da reação de Bradford (Bradford, 1976). 10 µL do sobrenadante foram adicionados a 200 µL de reagente de Bradford e a absorbância foi verificada a 595 nm. Os resultados foram interpolados a uma curva padrão de albumina sérica bovina.

Contagem diferencial das células: Após a centrifugação (descrita acima) os *pellets* foram ressuspensos em 1 mL de albumina sérica bovina 3%. 100 µL de cada amostra foram fixadas em lâminas e coradas com May-Grunwald Giemsa. As células MN e PMN foram diferenciadas de acordo com suas características morfológicas. Cem células foram contadas.

3.2.4 Edema de pata induzido pela Cg

Os camundongos foram tratados com EEGP (nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg), veículo (1% de Tween 80, v.o.) ou, dexametasona (0.5 mg/kg, s.c.) ou com

as frações BT (20 mg/kg, v.o.) e DCM (50 mg/kg, v.o.) ou como os compostos isolados GPC1 (1 mg/kg, v.o.) e GPC2 (1, 3, 10 e 30 mg/kg, v.o.) obtidos de *G. polymorpha* ssp. *floccosa*. Após uma hora, os animais receberam uma injeção i.pl. de 50 µL de PBS contendo Cg (300 µg) na pata direita. Na pata esquerda foi injetado o mesmo volume de PBS (controle). O aumento de volume da pata foi mensurado com o auxílio de micrômetro digital em diferentes tempos após o estímulo inflamatório. A diferença entre a espessura das patas direita e esquerda foi quantificada (em µm) e tomada como índice de edema (Kassuya *et al.*, 2009).

3.2.5 Atividade da mieloperoxidase (MPO)

A atividade da MPO foi determinada no tecido da pata dos animais que receberam injeção i.pl. de Cg. 6 horas após a injeção de Cg o tecido inflamado foi removido e congelado a -70°C para posteriores processamentos e análises. As amostras para a medida da atividade da MPO foram preparadas como descrito por De Young *et al.* (1989). Os tecidos foram homogeneizados em 0,5 mL de tampão fosfato (80 mM, pH de 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio e centrifugado 12.000 g, por 15 min, a 4 °C. 30 µL de sobrenadante das amostras foram pipetados em uma micro placa de 96 poços. Para o ensaio, 200 µL de uma solução contendo 100 µL PBS (80 mM, pH de 5,4), 85 µL de PBS (0,22 M, pH de 5,4) e 15 µL de peróxido de hidrogênio (0,017%) foram adicionados em cada poço. A reação foi iniciada pela adição de 20 µL de tetrametilbenzidina (18,4 mM, em 8% de dimetilformamida). A placa foi incubada a 37 °C por 3 minutos e a reação foi parada pela adição de 30 µL de acetato de sódio (1,46 M, pH de 3,0). A atividade enzimática

foi determinada colorimetricamente e expressa como mDO/mg proteína, sendo utilizado um leitor de ELISA (EL808, Bio-Tek Instruments, Inc.) com filtro de 620 nm.

3.2.6 Análise estatística

Os dados estão apresentados como média \pm E.P.M. A diferença entre os diferentes grupos foi avaliada por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

IV. RESULTADOS

4.1 Análise fitoquímica

Inicialmente observamos que o EEGP apresentava atividade antiinflamatória em dois modelos animais de inflamação. Dessa forma, um fracionamento biomonitorado a partir do EEGP foi realizado. O EEGP foi submetido ao fracionamento com solventes de polaridades crescentes para a obtenção das frações BT, DCM e AcOEt (figura 4). As frações BT e DCM, mas não a fração AcOEt demonstraram-se eficazes nos modelos estudados. A fração DCM foi submetida a novos fracionamentos para a obtenção dos compostos GPC1 e GPC2 (figura 5).

O composto GPC1 foi isolado como cristais na forma de mica. O seu espectro de RMN ^1H (figura 6A) mostrou sinais de um hidrogênio olefínico em δ 5.41 (*dd*, 2,9; 6,7 Hz), um hidrogênio carbinólico em δ 4,52 (*dd*, 4,2 Hz; 10,9 Hz), um grupo acetila em δ 2,06 (*s*, 3 H) e oito grupos metila em δ 1,05 (*d*, 7,2 Hz, 3 H); δ 1,04 (*s*, 3 H); δ 0,99 (*s*, 3 H); δ 0,94 (*s*, 3 H); δ 0,93 (*s*, 3 H); δ 0,91 (*d*, 5,9 Hz, 3 H); δ 0,85 (*s*, 3 H); δ 0,76 (*s*, 3 H). Esses dados são compatíveis com um triterpeno acetilado.

O espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado do GPC1 mostrou 31 sinais (figura 6B). Os sinais em δ 21,3, 81,1 e 171,0 confirmaram a presença de um acetato de triterpenila enquanto que os sinais dos carbonos sp^2 em δ 116,2 e 145,4 indicaram o esqueleto bauerenol. Através da análise dos espectros de RMN bidimensionais (HSQC e HMBC) e comparação com dados da literatura, o composto GPC1 foi identificado como acetato de bauerenila (figura 3A), um triterpeno previamente isolada de *G. polymorpha* (Farias *et al.*, 1984; Chakravarty *et al.*, 1998)

O composto GPC2 foi isolado como cristais em forma de agulha. O espectro de RMN ^1H do composto GPC2 (figura 7A) apresentou sinais característicos de hidrogênios olefínicos em δ 5,40 (*t*, 1,9 Hz; 1H), δ 5,32 (*t*, 1,9 Hz; 1H), δ 4,96 (*sl*, 1H) e δ 4,93 (*sl*, 1H), hidrogênios carbinólicos em δ 4,54 (*tt* 2,0 Hz; 7,6 Hz; 1H) e δ 4,14 (*t*, 9,7; 1H), vários multipletos referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos sp^3 e um sinal intenso em δ 1,17 (*d*, 7,8 Hz; 1H) referente a um grupo metila ligado a carbono sp^3 .

O espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado do composto GPC2 (figura 7B) mostrou a presença de quinze carbonos, caracterizando um sesquiterpeno. Os sinais em δ 83,7 e 179,6 indicaram a presença de um anel lactônico. O sinal em δ 73,5 indicou a presença de um álcool secundário. Os demais sinais mostraram tratar-se de uma lactona sesquiterpênica com esqueleto guaiano (guaianolídeo).

Através da análise dos espectros HSQC e HMBC e comparação com dados da literatura (Bohlmann e Chen, 1982) o composto GPC2 (figura 3B) foi identificado como 11, 13-diidrozaluzanina C, uma lactona sesquiterpênica previamente isolada de outras plantas, como *Ainsliaea fragans* (Bohlmann e Chen, 1982; Ando *et al.*, 1989) e isolada pela primeira vez em *G. polymorpha*.

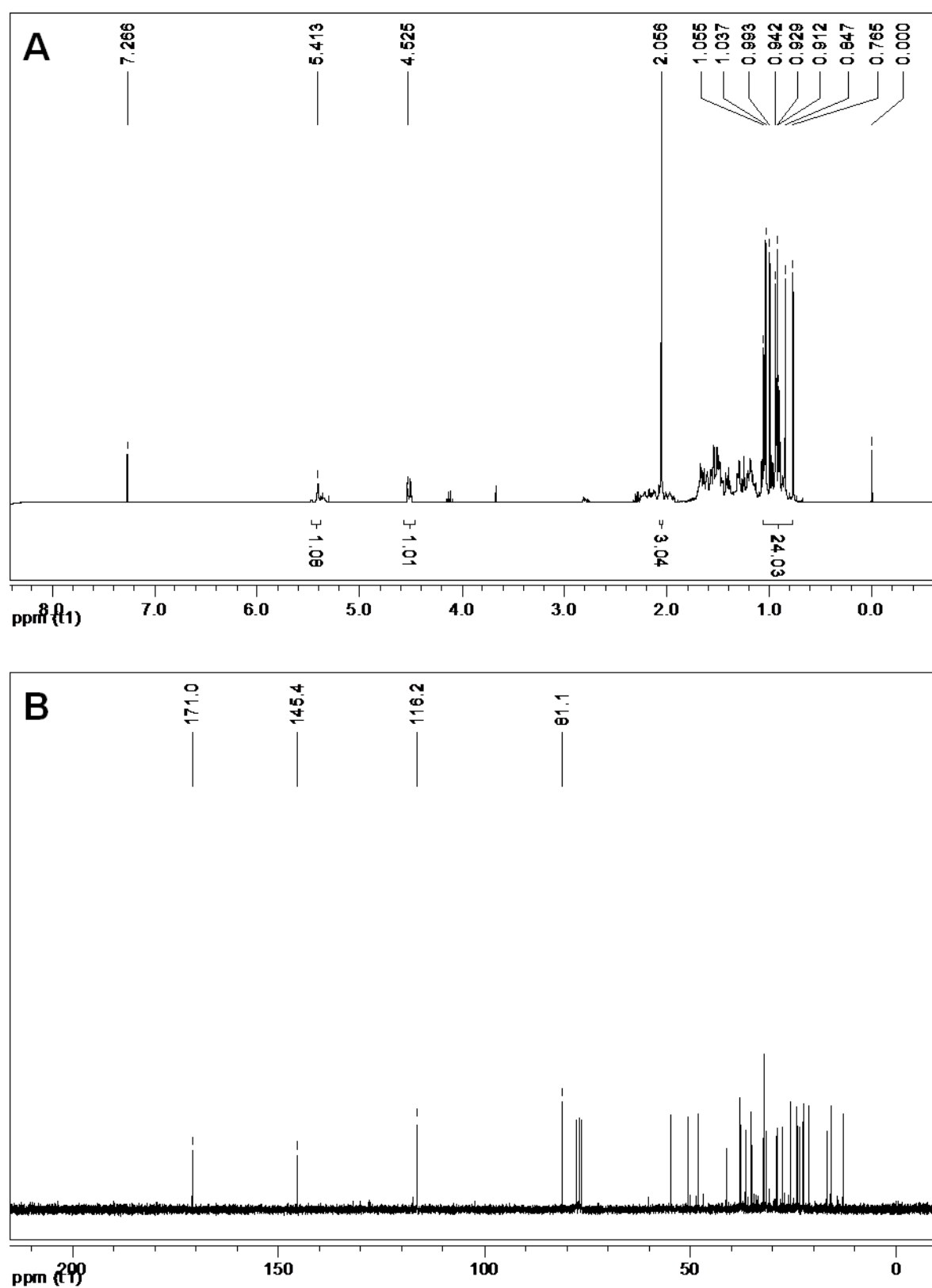


FIGURA 6 – ESPECTRO DE RMN ¹H (A) E RMN ¹³C DO (B) COMPOSTO GPC1.

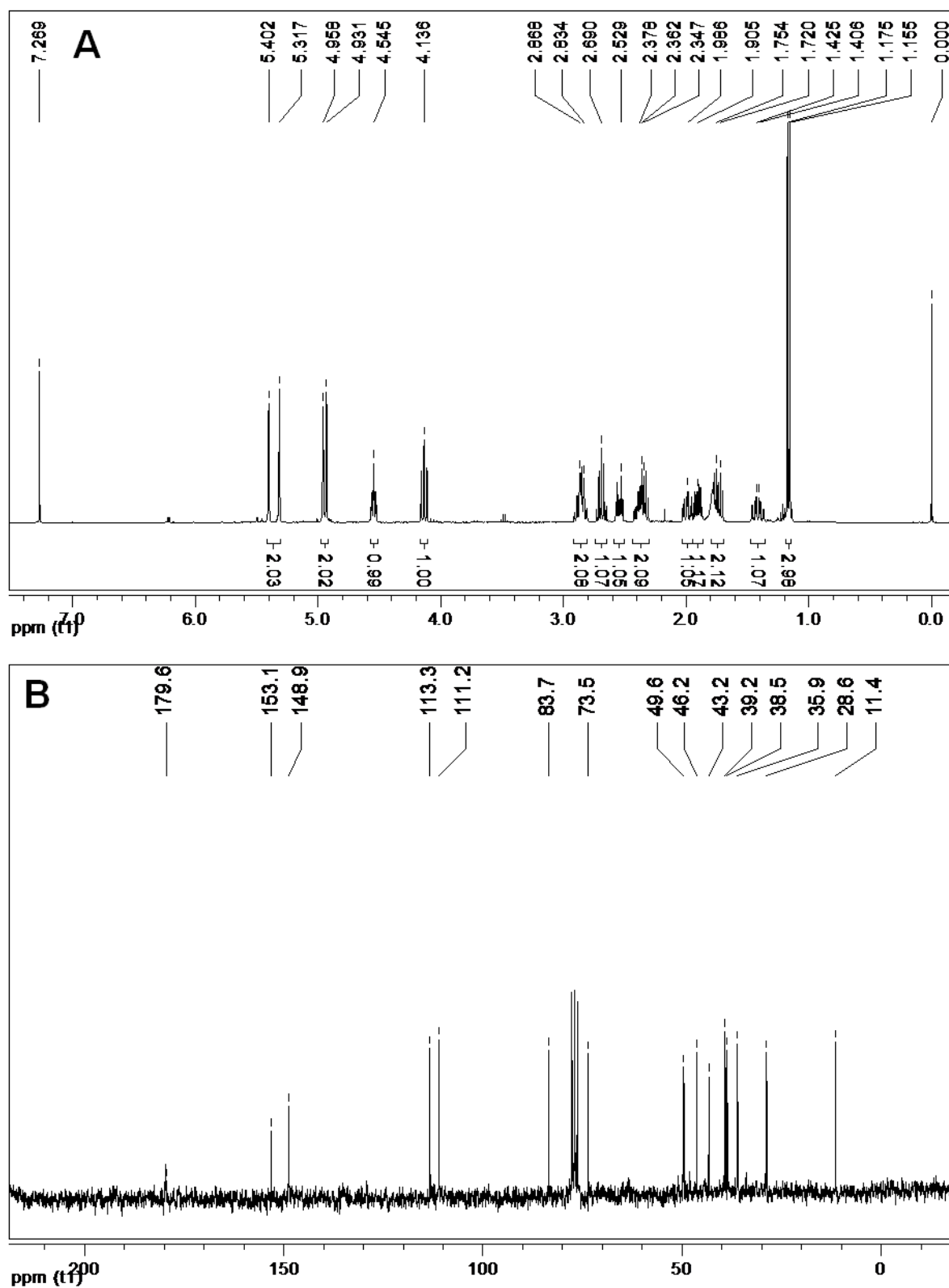


FIGURA 7 – ESPECTRO DE RMN ^1H (A) E RMN ^{13}C (B) DO COMPOSTO GPC2.

4.2 Análise farmacológica – Avaliação da atividade antiinflamatória

4.2.1 Efeito do EEGP nos modelos de inflamação na bolsa de ar e edema de pata induzido pela Cg

No modelo de inflamação na bolsa de ar os animais receberam o estímulo inflamatório (Cg) uma hora após os tratamentos. A injeção de Cg no interior da cavidade promove exsudação (extravasamento de fluido e proteínas do espaço intravascular para a cavidade) e migração de células inflamatórias (leucócitos) para a cavidade quatro horas após o estímulo. O tratamento por via oral dos animais com EEGP (30, 100 e 300 mg/kg) inibiu significativamente ($37,2 \pm 12,5$, $62,6 \pm 5,0$ e $54,3 \pm 6,8\%$, respectivamente), o número de leucócitos que migraram para a cavidade comparado ao grupo controle (Figura 8A). O extravasamento plasmático também foi inibido significativamente ($47,9 \pm 12,5$, $51,7 \pm 15,2\%$ e $60,9 \pm 13,7\%$, respectivamente) comparado ao grupo controle (Figura 8B). Com relação aos leucócitos mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) que migraram para a cavidade quatro horas após o estímulo inflamatório, pôde-se observar que o tipo celular predominante no exsudado inflamatório foram os PMN. O tratamento dos animais com EEGP nas diferentes doses inibiu significativamente a migração tanto de PMN quanto MN para a cavidade (figura 8C). A dexametasona, utilizada como controle positivo, inibiu significativamente a migração celular e o extravasamento plasmático ($76,7 \pm 5,5$ e $63,6 \pm 12,9\%$, respectivamente) e também o número de MN e PMN que migraram para a cavidade.

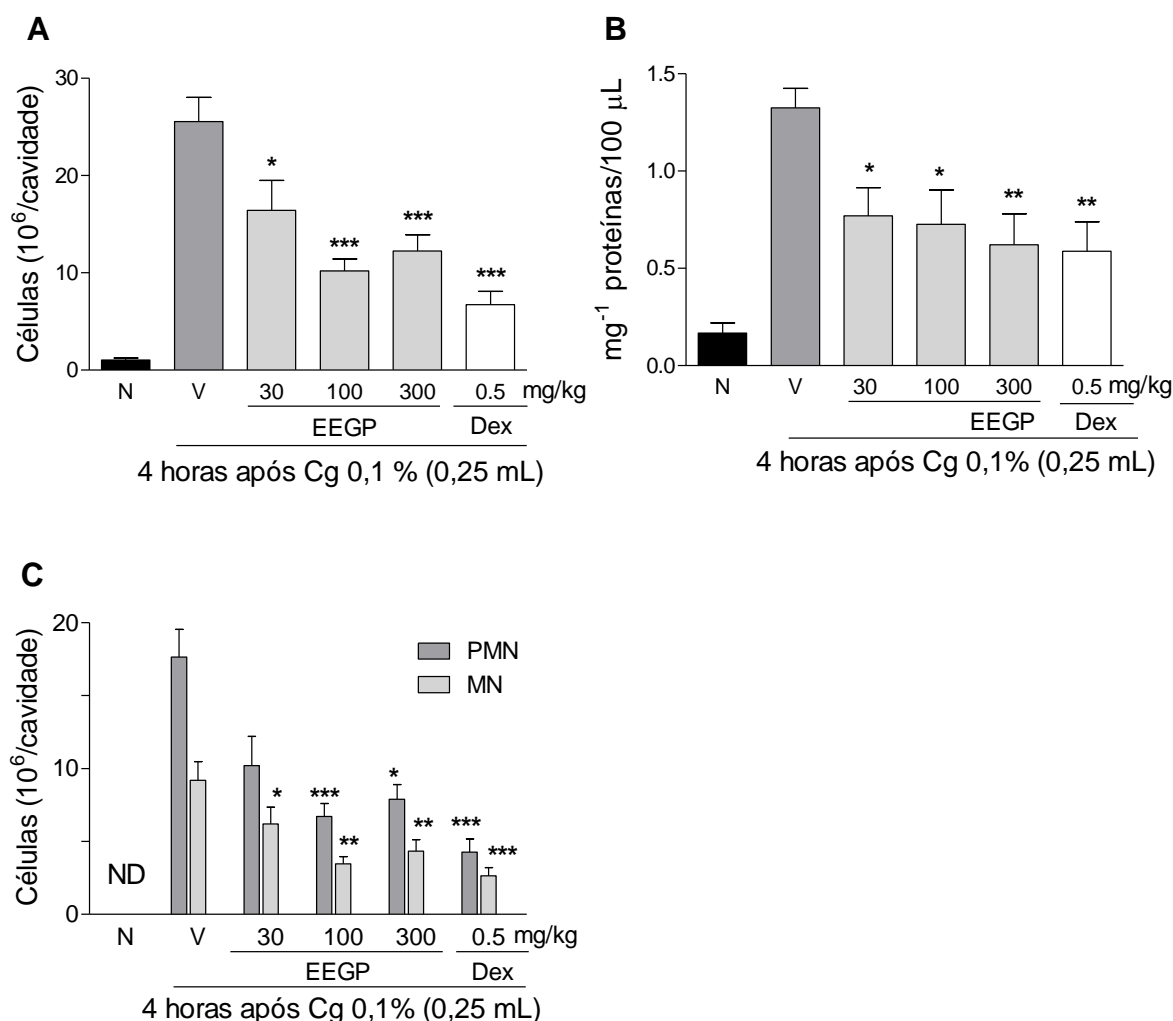


FIGURA 8 – EFEITO DO EEGP SOBRE A MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA E EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO PELA Cg NO MODELO DE INFLAMAÇÃO NA BOLSA DE AR. Os camundongos (n=8-10) foram tratados, uma hora antes da injeção de Cg, com EEGP (nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, v.o.), dexametasona (0.5 mg/kg, s.c.) ou veículo. A cavidade foi lavada como PBS heparinizado 4 horas após o início da inflamação. O número e o tipo celulares que migraram, bem como, o extravasamento plasmático induzido pela Cg foram analisados. **A**, número de leucócitos que migraram para a cavidade 4 horas após a injeção de Cg. Cada coluna representa o número de células x 10⁶/cavidade. **B**, extravasamento plasmático foi mensurado através da reação de Bradford. Cada coluna representa mg⁻¹/100 µL de amostra, de proteína. **C**, contagem diferencial dos leucócitos que migraram para a cavidade. As colunas representam o número de MN e PMN x 10⁶/cavidade. As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância (ANOVA de uma via) seguida pelo teste de Newman-Keuls. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$. N, naïve; V, veículo; MN, células mononucleares; PMN, polimorfonucleares; ND, não detectado.

O efeito antiinflamatório do EEGP foi avaliado também no edema de pata induzido pela Cg. Uma hora após os devidos tratamentos (EEGP, veículo e dexametasona), os animais receberam o estímulo inflamatório na pata. A injeção de Cg promoveu um aumento na espessura da pata (formação de edema), que alcançou o máximo de espessura duas horas após o estímulo (Figura 9A). O tratamento dos animais com EEGP (30, 100 e 300 mg/kg, v.o.) inibiram significativamente ($41,2 \pm 12,8\%$, $34,8 \pm 6,0\%$ e $60,4 \pm 9,7\%$, respectivamente) a formação de edema induzido pela Cg duas horas após o estímulo, em relação ao grupo controle, avaliando a espessura da pata inflamada como índice de edema. A dexametasona, utilizada como controle positivo, também inibiu significativamente ($53,2 \pm 11,7\%$) a formação de edema duas horas após a injeção de Cg (Figura 9B).

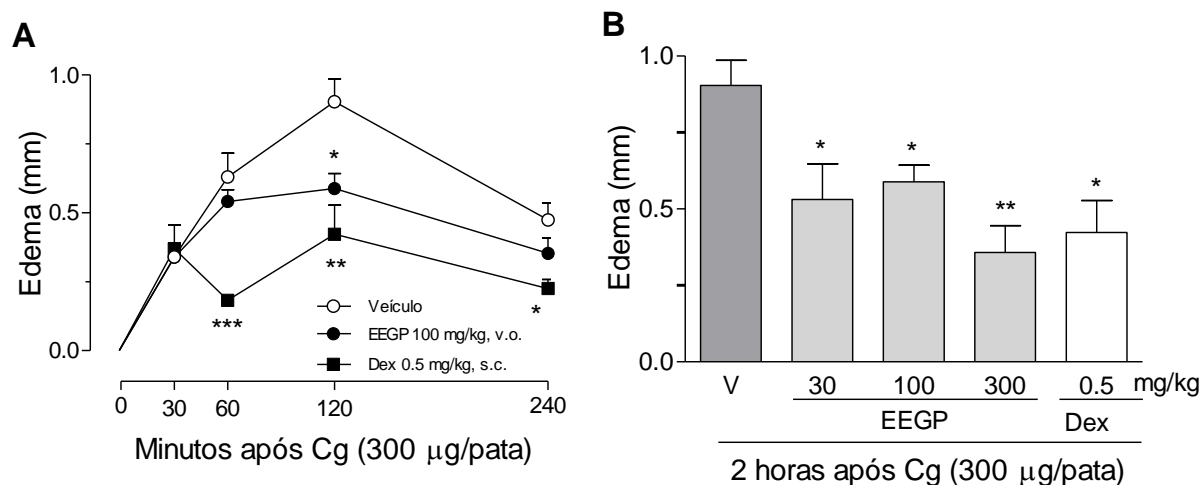


FIGURA 9 – EFEITO DO EEGP SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA Cg EM CAMUNDONGOS. Os animais (n=6) foram tratados com EEGP (nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, p.o.), dexametasona (0.5 mg/kg, s.c.) ou veículo. Uma hora após os tratamentos, os animais receberam uma injeção i.pl de Cg (300 µg/pata) como estímulo inflamatório. **A**, efeito do EEGP (100 mg/kg) sobre o curso temporal da formação de edema induzido pela Cg. **B**, efeito do EEGP, em diferentes doses, sobre o edema de pata 2 horas após a injeção de Cg. Cada barra representa a média ± EPM da espessura (mm) da pata dos animais 2 horas após a injeção de Cg. As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância (ANOVA de uma via) seguida pelo teste de Newman-Keuls. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. V, veículo.

4.2.2 Efeito das frações BT e DCM nos modelos de inflamação no bolsa de ar e edema de pata induzida pela Cg

Para avaliar o efeito antiinflamatório das frações BT e DCM sobre o extravasamento plasmático e migração celular no modelo de inflamação na bolsa de ar, os animais foram tratados com BT (20 mg/kg, v.o.), DCM (50 mg/kg, v.o.) e com dexametasona ou veículo, como descrito acima, uma hora antes da injeção de 0,25 mL de uma suspensão 0,1% de Cg no interior da cavidade). O tratamento dos animais com a fração DCM inibiu significativamente o extravasamento plasmático e a migração celular ($52,4 \pm 15,0$ e $29,5 \pm 10,6\%$, respectivamente) para a cavidade quatro horas após a injeção de Cg (Figura 10A e 10B, respectivamente). Ainda, o tratamento dos animais com a fração DCM inibiu significativamente o número de PMN que migraram para a cavidade durante a inflamação (Figura 10C). O tratamento dos animais com a fração BT, interessante, inibiu significativamente ($58,2 \pm 11,2\%$) o extravasamento plasmático, mas não a migração celular (leucócitos totais e PMN ou MN) para a bolsa de ar quatro horas após o estímulo com Cg, em relação ao grupo controle (Figura 10A, 10B e 10C, respectivamente).

No modelo de edema de pata induzido pela Cg em camundongos, o tratamento dos animais com as frações BT e DCM uma hora antes do estímulo inflamatório, inibiu significativamente ($70,2 \pm 11,5$ e $44,5 \pm 12,8\%$, respectivamente) a formação de edema na pata dos animais duas horas após a injeção do agente flogístico, em relação ao grupo controle. A dexametasona (controle positivo) também inibiu, de forma significativa ($88,2 \pm 8,0\%$) a formação de edema (Figura 10D).

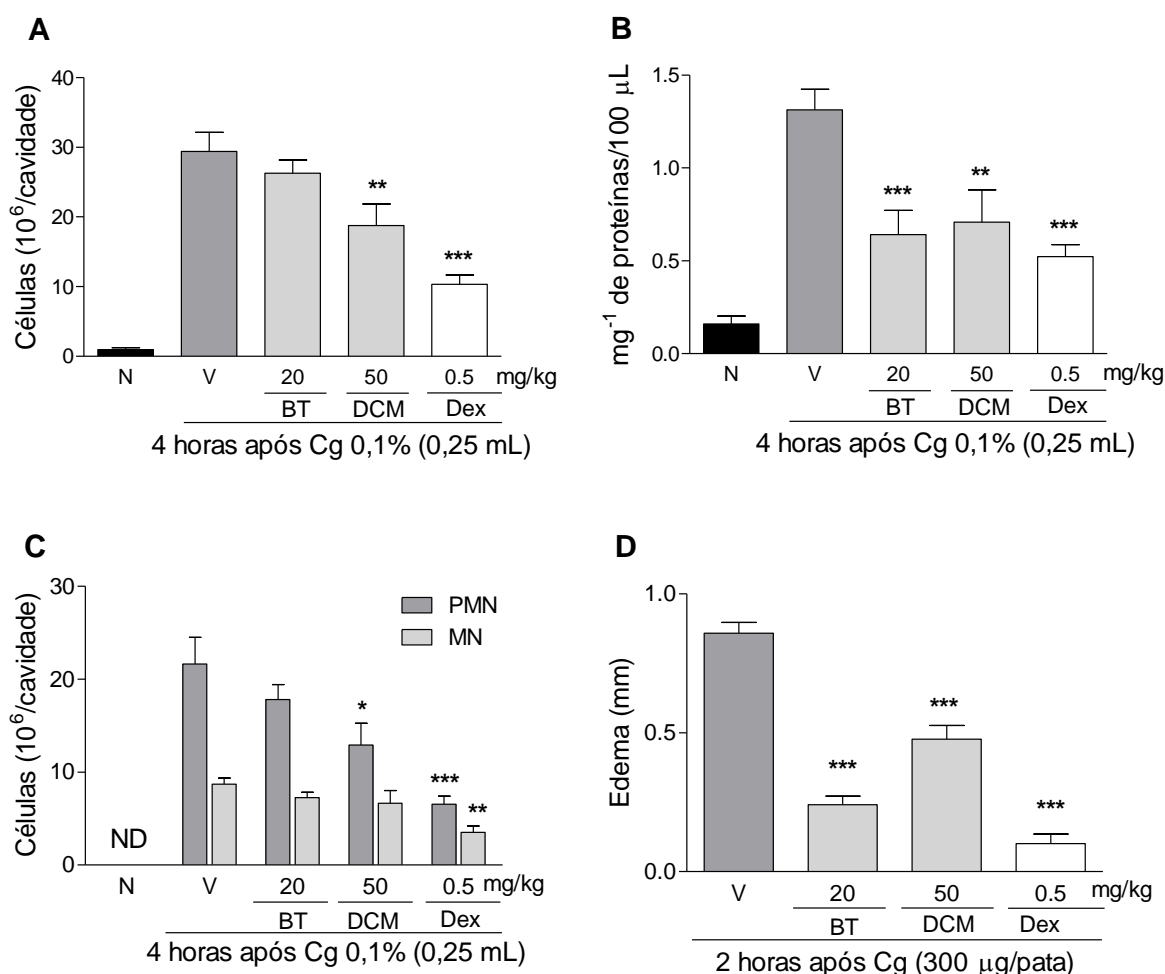


FIGURA 10 – EFEITO DAS FRAÇÕES BT E DCM SOBRE A INFLAMAÇÃO INDUZIDA PELA Cg NOS MODELOS DE INFLAMAÇÃO NA BOLSA DE AR E EDEMA DE PATA. Os animais foram tratados com BT (20 mg/kg, p.o.), DCM (50 mg/kg, p.o.), dexametasona (0.5 mg/kg, s.c.) ou veículo uma hora antes do estímulo inflamatório. **A**, efeito das frações sobre a infiltração de leucócitos induzido pela Cg no modelo de inflamação na bolsa de ar. Cada coluna representa a média \pm EPM (n=4-6) do número de leucócitos $\times 10^6$ /cavidade. **B**, efeito das frações sobre o extravasamento plasmático induzido pela Cg. Cada coluna representa a média \pm EPM (n=4-6) da quantidade de proteínas em mg⁻¹/100 μ L de amostra. **C**, contagem diferencial dos leucócitos que migraram para a cavidade. Cada coluna representa a média \pm EPM (n=4-6) do número de MN e/ou PMN $\times 10^6$ /cavidade. **D**, efeito das frações sobre o edema de pata induzido pela Cg. Cada coluna representa a média \pm EPM (n=6) da espessura da pata (mm) dos animais 2 horas após a injeção i.pl. de Cg. As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância (ANOVA de uma via) seguida pelo teste de Newman-Keuls. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$. N, naïve; V, veículo; MN, células mononucleares; PMN, polimorfonucleares; ND, não detectado.

4.2.3 Efeito dos compostos GPC1 e GPC2 obtidos da fração DCM nos modelos de inflamação na bolsa de ar e edema de pata induzido pela Cg

Inicialmente foi realizado um teste de triagem utilizando o modelo de edema de pata induzido pela Cg, no qual os animais foram tratados com os dois compostos (GPC1 e GPC2) nas doses de 1 mg/kg, v.o. e 10 mg/gk, v.o., de acordo com o rendimento dos compostos em relação a dose da fração DCM utilizada anteriormente. O tratamento por via oral dos animais com o composto GPC2, mas não com o composto GPC1, nas doses empregadas, foi capaz de inibir significativamente a formação de edema na pata dos animais duas horas após a injeção de Cg. A dexametasona (controle positivo) também foi capaz de inibir a formação de edema na pata dos animais (Figura 11).

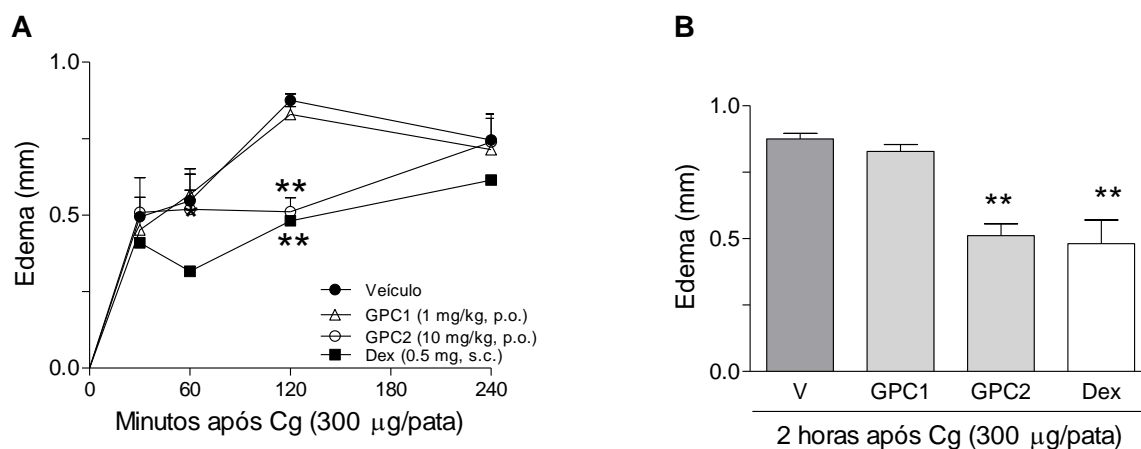


FIGURA 11 – EFEITO DO GPC1 E GPC2 SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA Cg EM CAMUNDONGOS. Os animais foram tratados com GPC1 (1mg/kg, p.o.), GPC2 (10 mg/kg, p.o.), dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) ou veículo, uma hora antes da injeção i.pl. de Cg (300 µg/pata). **A**, efeito do GPC1 e GPC2 sobre o curso temporal da formação de edema induzido pela injeção de Cg. **B**, Representação em colunas do efeito dos compostos GPC1 e GPC2 sobre o edema de pata induzido pela Cg 2 horas após a indução. Cada ponto ou coluna representa a média \pm EPM ($n=6$) da espessura (mm) da pata dos animais. As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância (ANOVA de uma via) seguida pelo teste de Newman-Keuls. Valores de $P<0.05$ foram considerados significativos. * $P<0.05$, ** $P<0.01$. V, veículo.

Dessa forma, decidimos continuar avaliando a atividade antiinflamatória do composto GPC2 nos modelos de inflamação na bolsa de ar e edema de pata, ambos induzidos pela Cg.

O composto GPC2 foi, posteriormente, avaliado quanto à sua atividade antiinflamatória em diferentes doses (1, 3, 10 e 30 mg/kg, v.o.) no modelo de edema de pata induzido pela Cg. O tratamento dos animais com o composto GPC2 nas doses de 10 e 30 mg/kg, v.o. e também com dexametasona (controle positivo), uma hora antes do estímulo inflamatório, inibiram significativamente o edema ($29,5 \pm 4,8$, $31,7 \pm 5,4$ e $45,5 \pm 5,8\%$, respectivamente), duas horas após a injeção i.pl. de Cg, em relação ao grupo controle (Figura 12A e 12B). 6 horas após a injeção i.pl. de Cg, o tecido inflamado das patas dos animais foi removido e a atividade da enzima MPO foi determinada como indicativo indireto da migração de neutrófilos para o sítio inflamatório. O tratamento dos animais com o composto GPC2 nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg, p.o. e também a dexametasona inibiram significativamente ($30,6 \pm 9,4$, $51,3 \pm 3,4$ e $54,6 \pm 2,4$ e $58,2 \pm 1,9\%$ respectivamente), a atividade da enzima MPO, comparado ao grupo controle (Figura 12C).

No modelo de inflamação na bolsa de ar induzida pela Cg, o tratamento dos animais com o composto GPC2 (10 mg/kg, v.o.) e também com a dexametasona uma hora antes do estímulo inflamatório, reduziu de forma significativa o extravasamento plasmático ($51,8 \pm 11,7$ e $91,0 \pm 9,6\%$, respectivamente), bem como, a migração celular ($54,4 \pm 21,8$ e $77,2 \pm 20,8\%$, respectivamente) quatro horas após a injeção de Cg na cavidade, comparado ao grupo controle (Figura 13A e 13B). Tanto o número de MN quanto de PMN na bolsa de ar foi reduzido, de forma significativa, pelo tratamento com GPC2 e dexametasona (Figura 13C).

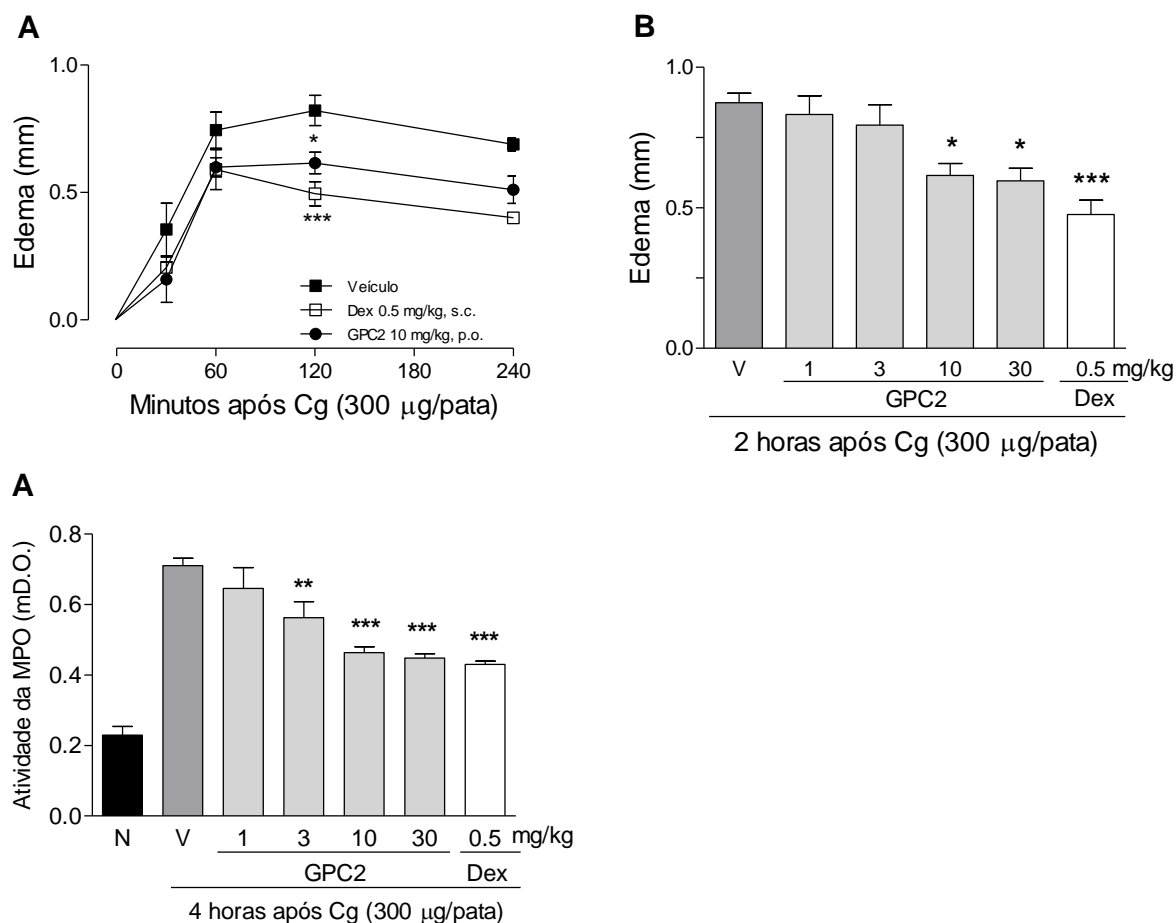


FIGURA 12 – EFEITO DO GPC2 SOBRE O EDEMA DE PATA E SOBRE O AUMENTO DA ATIVIDADE DA MPO INDUZIDO PELA Cg. Os animais foram tratados com GPC2 (nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg, p.o.), dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.) ou veículo uma hora antes da injeção i.pl. de Cg (300 µg/pata). **A**, efeito do GPC2 (10 mg/kg) sobre o curso temporal da formação de edema induzido pela Cg. **B**, efeito do GPC2, em diferentes doses, sobre o edema de pata induzido pela Cg 2 horas após a indução. Cada ponto ou coluna representa a média \pm EPM ($n=6$) da espessura (mm) da pata dos animais. **C**, efeito do GPC2 sobre a atividade da enzima MPO no tecido inflamado, como indicativo indireto da migração de neutrófilos, 6 horas após a injeção de Cg. Cada coluna representa a média \pm EPM da atividade enzimática, representada em mD.O./mg de proteínas. As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância (ANOVA de uma via) seguida pelo teste de Newman-Keuls. Valores de $P<0.05$ foram considerados significativos. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ e *** $P<0.001$. N, naïve; V, veículo.

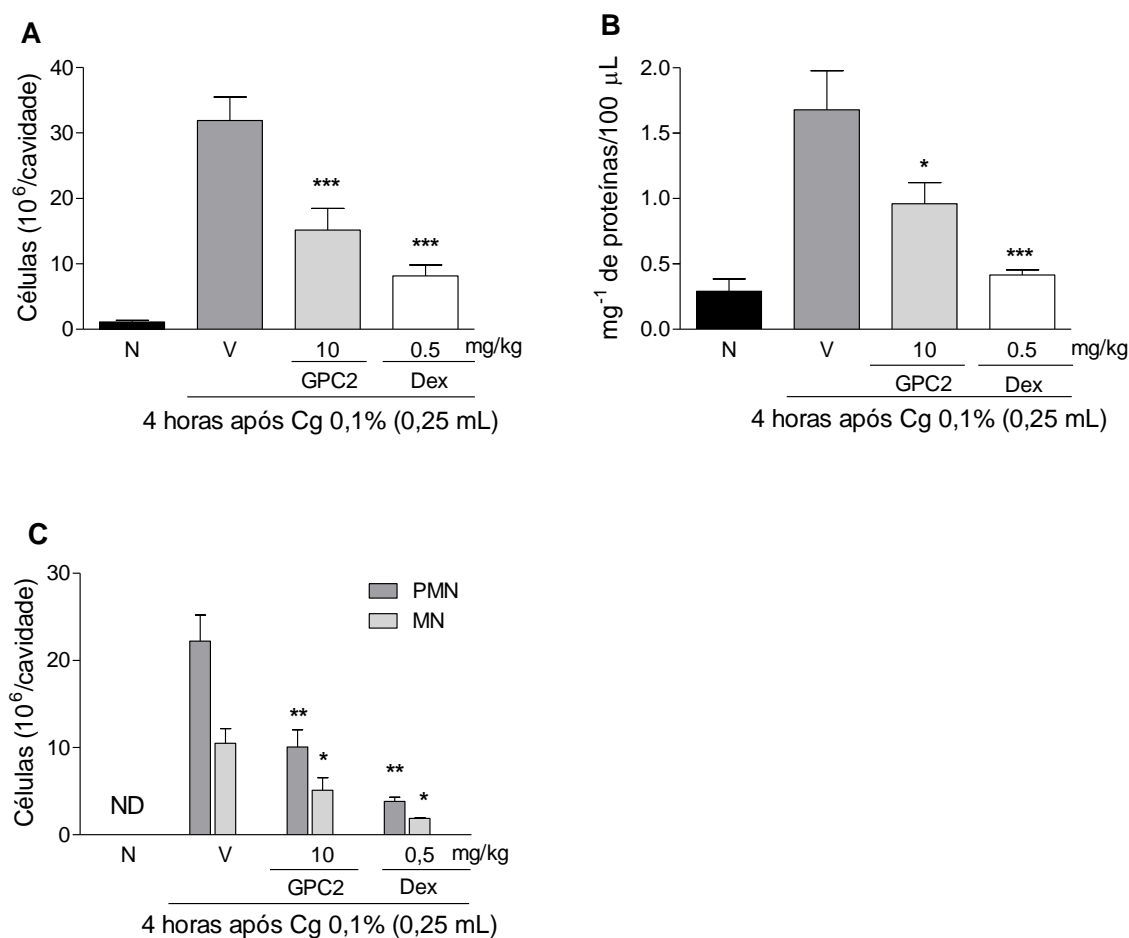


FIGURA 13 – EFEITO DO GPC2 SOBRE A INFILTRAÇÃO LEUCOCITÁRIA E EXTRAVASAMENTO PLASMÁTICO INDUZIDO PELA Cg NO MODELO DE INFLAMAÇÃO NA BOLSA DE AR. Os animais (n=8-10) foram tratados com GPC2 (10 mg/kg, p.o.), dexametasona (0,5 mg/kg, p.o.) ou veículo uma hora antes do estímulo inflamatório. Quatro horas após o estímulo inflamatório as cavidades foram lavadas com PBS heparinizado. O número e o tipo celulares que migraram, além do extravasamento plasmático induzido pela Cg foram analisados. **A**, efeito do GPC2 sobre a migração leucocitária para a bolsa de ar 4 horas após a injeção de Cg. **B**, efeito do GPC2 sobre o extravasamento plasmático induzido pela Cg 4 horas após a indução. **C**, efeito do GPC2 sobre a migração de células MN e PMN para o bolsa de ar 4 horas após a injeção de Cg. Cada coluna representa a média \pm EPM do número de células/cavidade ou da quantidade de proteínas em mg⁻¹/100 μ L de amostra. As diferenças entre os grupos foram analisadas por análise de variância (ANOVA de uma via) seguida pelo teste de Newman-Keuls. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$. N, naïve; V, veículo; MN, células mononucleares; PMN, polimorfonucleares; ND, não detectado.

V. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o tratamento por via oral com o EEGP, frações (BT e DCM) e com o composto GPC2 isolado de *G. polymorpha* ssp. *floccosa* reduziu de maneira significativa parâmetros inflamatórios como edema e migração de leucócitos induzidos pela Cg em camundongos. Estudos fitoquímicos demonstraram a presença do composto GPC2, uma lactona sesquiterpênica, identificada por métodos espectroscópicos como 11, 13-diidrozaluzanina C na fração DCM. Esse composto demonstrou atividade antiinflamatória, reduzindo a formação de edema, extravasamento plasmático e migração celular induzido pela Cg em camundongos. Os resultados do presente estudo são relevantes, pois, a *G. polymorpha* é utilizada na medicina popular como antiinflamatório.

O processo inflamatório é um componente presente em várias doenças crônicas como a asma, câncer, aterosclerose, artrite reumatóide, várias doenças auto-imunes (diabetes mellitus tipo I, doença de Chron, psoríase), obesidade e doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer e esclerose múltipla entre outras. Como os eventos patogênicos primários dessas várias doenças não são conhecidos ou bem estabelecidos, a inflamação é o melhor alvo “drogável”, ou seja, passível de intervenção farmacológica. Embora as pesquisas busquem possíveis causas infecciosas para doenças como esclerose múltipla, artrite reumatóide e aterosclerose, o processo inflamatório comum a todas elas é, ainda, um dos principais alvos terapêuticos. Além do mais, em determinadas ocasiões o processo inflamatório pode causar mais dano que o próprio agente invasor/agressor (Nathan, 2002).

A busca por novas drogas antiinflamatórias é necessária, considerando que algumas doenças não são tratadas adequadamente com os medicamentos antiinflamatórios atuais e, ainda, considerando os vários efeitos adversos advindos das principais drogas antiinflamatórias. Deve-se levar em consideração, também, o aumento na incidência das doenças inflamatórias como a asma e muitas outras que podem estar relacionadas ao estilo de vida moderna, principalmente em países desenvolvidos (Mackay, 2008). Com relação à descoberta e desenvolvimento de novas drogas, as plantas ainda constituem uma importante fonte de novas drogas, novos protótipos e novas entidades químicas. Um número relativamente alto de drogas utilizadas atualmente é derivado de produtos naturais, principalmente de plantas, e vários compostos oriundos de produtos naturais ou derivados destes se encontram em estudos clínicos para o tratamento de diversas patologias (Balunas e Kinghorn, 2005; Saklani e Kutty, 2008). Saklani e Kutty (2008) descrevem um total de 91 compostos derivados de plantas em estágio de triagem clínica até o ano de 2007 e 26 drogas oriundas de plantas e compostos derivados de moléculas oriundas de plantas aprovadas e lançadas no mercado durante os anos de 2000 e 2006. Um número relativamente alto das drogas de origem natural foram descobertas a partir de estudos químicos e isolamento de substâncias ativas de plantas utilizadas na medicina popular (Newman *et al.*, 2000).

O desenvolvimento de novas drogas para tratar doenças inflamatórias depende da existência de modelos animais adequados para a avaliação desses agentes. Embora a maioria das doenças inflamatórias severas e debilitantes seja de natureza crônica, modelos inflamatórios agudos são importantes para a descoberta e triagem, “screening” de novas drogas por serem mais simples e também reproduzíveis. Os

modelos de inflamação aguda também são adequados para a investigação da transição do processo agudo para crônico (Sedgwick e Lees, 1986).

O processo inflamatório induzido pela carragenina é um processo agudo, não imune, altamente reproduzível e bem estudado. A carragenina quando injetada subcutaneamente na região plantar do animal, é capaz de produzir os sinais cardinais da inflamação – edema (tumor), eritema (rubor) e hiperalgesia (maior sensibilidade à estímulos dolorosos) – que se desenvolvem rapidamente em decorrência da ação de vários mediadores pró-inflamatórios derivados do plasma ou das células envolvidas na resposta inflamatória. Bradicinina, histamina, serotonina, taquicininas, fragmentos do complemento (C3a e C5a), espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, mediadores lipídicos (ex. prostaglandinas e PAF), citocinas (ex. TNF- α , IL1- β), quimiocinas (ex. IL-8) e enzimas proteolíticas são exemplos dos mediadores envolvidos na resposta do organismo frente a um estímulo inflamatório (Morris, 2003). A inibição do edema induzido pela carragenina na pata dos animais por uma determinada droga é altamente preditiva de ação antiinflamatória da droga em estados inflamatórios em humanos. Foi através do modelo de edema de pata induzido pela carragenina que pesquisadores da Merck, Sharp & Dohme demonstraram a atividade antiinflamatória da indometacina. Portanto, esse modelo foi, e continua sendo importante para o desenvolvimento de novas drogas com potencial antiinflamatório (Morris, 2003; Willoughby, 2003)

Com o reconhecimento do importante papel dos leucócitos tanto nos processos inflamatórios agudos quanto nos processos inflamatórios crônicos, muita atenção tem sido atribuída a modelos animais de inflamação aguda que permitam a quantificação estimativa da migração desses leucócitos. Os modelos animais envolvendo cavidades como a cavidade pleural, peritoneal, e também o modelo de

inflamação na bolsa de ar permitem que a migração celular, mediadores inflamatórios e extravasamento plasmático sejam quantitativamente mensurados após um processo inflamatório agudo, induzido por diferentes agentes irritantes aplicados no interior da cavidade (Sedgwick e Lees, 1986). A bolsa de ar consiste em uma cavidade limpa, formada por repetidas injeções subcutânea de ar estéril no dorso do animal (rato ou camundongo). Seis dias após a injeção de ar o tecido que reveste a bolsa de ar apresenta-se similar ao tecido de revestimento sinovial. Portanto, esse modelo simula o processo inflamatório na cavidade sinovial (Edwards *et al.*, 1981).

Considerando a importância das plantas medicinais como fonte de novas drogas úteis para o tratamento de diversas patologias e o envolvimento do processo inflamatório em inúmeras doenças, buscamos uma planta que fosse utilizada popularmente para tratar condições inflamatórias para a realização de um estudo biomonitorado com a finalidade de isolar compostos com atividade antiinflamatória. *G. polymorpha* ssp. *floccosa*, conhecida popularmente como “cambará”, e utilizada na medicina popular para tratar afecções do trato respiratório e condições inflamatórias, foi escolhida. Um estudo realizado no ano de 2000 relata a atividade antiinflamatória (antiedematogênica) do extrato hidroalcoólico das folhas de um exemplar de *G. polymorpha*, espécie não identificada (Moreira *et al.*, 2000). Outros fatores que contribuíram para a escolha dessa planta, além do uso na medicina popular e escassez de estudos farmacológicos, foi a grande variabilidade química encontrada em exemplares de *G. polymorpha* oriundos de diferentes lugares.

Inicialmente avaliamos a atividade antiinflamatória do EEGP (extrato etanólico de *G. polymorpha*) nos modelos de edema de pata induzido pela Cg e inflamação na bolsa de ar, também induzido pela Cg onde o pré-tratamento dos animais com o

EEGP inibiu a formação do edema e a migração de leucócitos pro sítio inflamatório, respectivamente. Esses resultados sugeriram que o extrato apresenta atividade antiinflamatória. No entanto, não se pode concluir que o chá e/ou o xarope das folhas, flores e cascas do tronco - formas nas quais a *G. polymorpha* é utilizada na medicina popular – apresenta atividade antiinflamatória, uma vez que utilizamos o extrato etanólico. Porém, a atividade antiinflamatória do EEGP é um indício de uma possível atividade antiinflamatória da planta nas formas utilizadas na medicina popular. Contudo, fica evidenciada a importância do conhecimento etnofarmacológico para a seleção de plantas como fontes de extratos, frações e compostos isolados dotados de atividade biológica. O EEGP foi submetido, posteriormente, a um fracionamento com solventes de diferentes polaridades, rendendo as frações em AcOEt, CH₂Cl₂ (DCM) e BuOH (BT). As três frações foram avaliadas nos mesmos modelos animais de inflamação. A fração AcOEt não demonstrou atividade antiinflamatória na dose empregada. As frações DCM e BT demonstraram atividade antiinflamatória nas doses empregadas, cuja escolha foi determinada de acordo com o rendimento das frações e calculadas em relação a dose de 100 mg/kg de EEGP. A fração BT inibiu significativamente a formação de edema no modelo de edema de pata induzido pela Cg e o extravasamento plasmático induzido pela Cg no modelo de inflamação na bolsa de ar, porém, não inibiu a migração de leucócitos para a cavidade. De interesse, a fração BT exibiu um perfil de atividade semelhante aos AINEs, que são capazes de inibir o edema sem, contudo, inibir a migração celular durante o processo inflamatório. A fração DCM também inibiu a formação de edema induzido pela Cg e extravasamento plasmático induzido pela Cg no modelo de inflamação na bolsa de ar. Diferentemente da fração BT, a fração DCM foi capaz de inibir a migração de leucócitos no modelo de

inflamação no bolsa de ar induzido pela Cg. Esses dados sugerem que ambas as frações contém compostos biologicamente ativos responsáveis pela atividade antiinflamatória.

Por conseguinte, devido a ação da fração DCM frente à resposta edematogênica e também à migração celular, conduzimos nossos estudos com esta fração. A fração DCM foi submetida a fracionamentos originando dois compostos isolados que, por meio de técnicas espectrométricas, foram identificados como acetato de bauerenila (GPC1), um triterpeno previamente isolado de *G. polymorpha* (Farias *et al.*, 1984); e 11, 13-diidrozaluzanina C uma lactona sesquiterpênica previamente isolada de outras plantas, como *Ainsliaea fragans* Champ. (Bohlmann e Chen, 1982; Feng *et al.*, 2009) e isolada pela primeira vez em *G. polymorpha*. Somente o GPC2 demonstrou atividade antiinflamatória no modelo de edema de pata induzido pela Cg. O GPC1, na dose empregada, não foi eficaz, no entanto, tal resultado não caracteriza a ausência de atividade do composto em maiores doses. Posteriormente a atividade antiinflamatória do GPC2 foi avaliada novamente no modelo de edema de pata induzido pela Cg e também no modelo de inflamação na bolsa de ar. O GPC2 inibiu a formação de edema induzido pela Cg e a atividade da MPO no tecido inflamado. A MPO é uma enzima presente principalmente nos neutrófilos, portanto, o aumento na atividade da MPO é um indicativo indireto da presença de um maior número de neutrófilos no tecido inflamado. Corroborando com os achados no modelo de edema de pata, e com a redução da atividade da MPO, o GPC2 reduziu significativamente o extravasamento plasmático e a migração celular induzido pela Cg no modelo de inflamação na bolsa de ar.

O composto GPC2 é uma lactona sesquiterpênica. Os sesquiterpenos, pertencem a uma classe de metabólitos secundários conhecido genericamente

como terpenóides, no qual se inclui também, além dos sesquiterpenóides, que apresentam 15 átomos de carbono em suas moléculas, os monoterpenóides, os diterpenóides e triterpenóides que apresentam 5, 20 e 30 átomos de carbono em suas moléculas, respectivamente (Salminen *et al.*, 2008). As lactonas sesquiterpênicas, são encontradas quase que exclusivamente em plantas da família Asteraceae, mas também ocorrem de maneira esporádica em outras famílias de angiospermas (Seaman, 1982; Neerman, 2003). Geralmente, as lactonas sesquiterpênicas são substâncias incolores, amargas, relativamente estáveis e lipofílicas. Com base nas diferenças do esqueleto carbocíclico, esses compostos são classificados em quatro grupos: germacranolidos (anel de dez membros), guaianolidos (um anel de cinco membros e um anel de sete membros fundidos entre si), pseudoguaianolidos e eudesmanolidos (dois anéis de seis membros fundidos entre si) (Yoshioka *et al.*, 1973; Neerman, 2003). O GPC2 é um guaianolido, caracterizado pela presença de um anel de sete carbonos conjugado com um anel de cinco carbonos.

As atividades farmacológicas de algumas plantas, especialmente da família Asteraceae são atribuídas ao seu conteúdo de lactonas sesquiterpênicas como mikanolideo, helenalina, partenolideo, e artemisina (Valerio *et al.*, 2007). De fato, as lactonas sesquiterpênicas podem apresentar uma variedade de atividades, incluindo atividade antimicrobiana, antiviral e antitumoral (Chen *et al.*, 1994; Meshnick, 2002; Perretti e Getting, 2003). Vários extratos de plantas ricos em lactonas sesquiterpênicas tem suscitado considerável interesse para o tratamento de diversas patologias (Ghantous *et al.*, 2010).

Mais de 7.000 compostos sesquiterpênicos foram descritos e caracterizados, sendo as lactonas sesquiterpênicas as substâncias mais frequentemente

encontradas em produtos naturais utilizados na medicina popular. Os sesquiterpenóides são conhecidos inibidores da via de sinalização do NF- κ B. Exemplos de lactonas sesquiterpênicas encontradas em plantas medicinais são o partenolideo, presente na *Tanacetum parthenium*, planta utilizada na medicina popular para tratar enxaqueca e desordens inflamatórias como a artrite; a helenalina A, presente na *Arnica flos*; costunolideo, encontrado na *Saussurea costus*; artemisina, presente na *Artemisia annua*; e seu derivado artemisolídeo; ergolídeo e nepalolídeo são outros exemplos (Salminen *et al.*, 2008). Outras lactonas sesquiterpênicas isoladas de plantas utilizadas na medicina popular como a *Montanoa hibiscifolia* e a *Viguiera gardneri* são capazes de inibir o NF- κ B. Lactonas sesquiterpênicas isoladas das flores de *Arnica* spp foram responsáveis pela inibição da ativação do NF- κ B, NF-AT (fator nuclear de células T ativadas) e inibição da liberação de TNF- α e IL-1. (Talhouk *et al.*, 2007).

Interessantemente, lactonas sesquiterpênicas estruturalmente similares ao GPC2, como a 8 α - hidroxí-11 α ,13- diidrozaluzanina C, zaluzanina-C and estafiatona também inibem a via de sinalização do NF- κ B e, dessa forma, apresentam atividade antiinflamatória. A zaluzanina C e a esteafitona foram isoladas da *Ainsliaea acerifolia*, uma planta utilizada como antipirética, analgésica e antiinflamatória na medicina popular coreana. Os estudos com esses compostos revelaram que eles são capazes de inibir a ativação do NF- κ B. Os pesquisadores mostraram que os dois compostos inibem a expressão das enzimas iNOS e COX-2 em macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS por meio da inibição da degradação do I κ B e, consequentemente, inibição da ativação do NF- κ B (Shin *et al.*, 2005).

Outros análogos do GPC2 como a 8α -hidroxi- $11\alpha,13$ -diidro- 3β -O- β -D-glucozaluzanina C, a 8α -hidroxi- $11\alpha,13$ -diidrozaluzanina C, a 3α -hidroxi- $11\beta,13$ -diidro- 8α -O- β -D-glucozaluzanina C, a 3β -hidroxi- $11\beta,13$ -diidro- 8α -O- β -D-glucozaluzanina C, e a 3β -O- β -D-glucozaluzanina C, inibem a COX-1 e COX-2 *in vitro* (Wang *et al.*, 2009). A COX-1 e COX-2 são os alvos farmacológicos dos AINEs, amplamente utilizados clinicamente para o tratamento de condições inflamatórias.

Nenhum estudo demonstrando o potencial antiinflamatório, bem como outras atividades biológicas da lactona sesquiterpênica 11, 13-diidrozaluzanina C, isolada anteriormente de *Ainsliaea fragrans* Champ. por Feng e colaboradores (Feng *et al.*, 2009), foi encontrado nos bancos de dados analisados.

Com base nos resultados encontrados e nos dados da literatura que atribuem uma atividade inibidora da via de sinalização do NF- κ B aos terpenóides e, também, com base na atividade inibidora da degradação do I κ B e, conseqüentemente, inibição do NF- κ B por lactonas sesquiterpênicas estruturalmente similares ao GPC2, especulamos que o GPC2 possa atuar de tal forma, inibindo essa via de sinalização e, conseqüentemente, diminuindo a expressão de genes codificadores de proteínas pró-inflamatórias. Como mencionado acima, compostos análogos ao GPC2 exibiram atividade inibidora das enzimas COX-1 e COX-2, no entanto, somente a inibição dessas enzimas metabolizadoras do AA não explicaria a inibição da migração de leucócitos para o foco inflamatório que pôde ser observado com o tratamento dos animais com o GPC2 nos modelos de edema de pata e inflamação na bolsa de ar ambos induzido pela Cg. É sabido que o processo de migração celular durante o processo inflamatório depende da expressão de moléculas de adesão na superfície

das células endoteliais e, que esse processo é governado pela ativação de fatores de transcrição como o NF-kB, AP-1 entre outros, que modulam a transcrição gênica. Contudo, esse mecanismo proposto trata-se de especulação, e novos trabalhos devem ser realizados para a elucidação do mecanismo de ação desse composto.

VI. CONCLUSÃO

O extrato etanólico das cascas do tronco de *G. polymorpha ssp floccosa* possui atividade antiinflamatória nos modelos animais de inflamação estudados.

O fracionamento biomonitorado do EEGP resultou na obtenção de duas frações dotadas de atividade antiinflamatória, nas doses preconizadas. As frações BT e DMC nas doses de 20 mg/kg e 50 mg/kg, respectivamente, demonstraram-se eficazes em inibir os parâmetros inflamatórios avaliados. A fração AcOEt não demonstrou atividade na dose utilizada. A fração BT inibiu a formação de edema induzido pela Cg e o extravasamento plasmático no modelo de inflamação induzido pela Cg, porém, não inibiu a migração de leucócitos para o foco inflamatório, mostrando um perfil similar aos AINEs. A fração DCM inibiu todos os parâmetros inflamatórios

O GPC2 inibiu o edema de pata induzido pela Cg nas doses de 10 e 30 mg/kg. A atividade da MPO também foi inibida pelo GPC2 nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg. No modelo de inflamação na bolsa de ar o GPC2, na dose de 10 mg/kg, inibiu o extravasamento plasmático e a migração celular para o foco inflamatório. O GPC1 na dose de 1 mg/kg não foi eficaz no modelo de edema de pata, contudo, não se pode concluir que esse composto carece de atividade biológica.

O GPC2 é uma lactona sesquiterpênica. Esses compostos são conhecidos inibidores da via de sinalização do NF- κ B. Dessa forma, especulamos que o GPC2 possa atuar de tal maneira, porém, estudos devem ser realizados para elucidar essa hipótese.

VII. REFERÊNCIAS

ANDO, M. *et al.* Studies on the Syntheses of Sesquiterpene Lactones .11. The Syntheses of 3-Epizaluzanin-C, Zaluzanin-C, Zaluzanin-D, and Related-Compounds 3alpha-Hydroxyguaia-1(10),4(15),11(13)-Trieno-12,6alpha-Lactone and 3alpha-Hydroxyguaia-4(15),9,11(13)-Trieno-12,6alpha-Lactone. *Journal of Organic Chemistry*, v. 54, n. 8, p. 1952-1960, 1989.

ARAMBARRI, A. M. *et al.* Leaf anatomy of medicinal shrubs and trees from misiones Forest of the Paranaense Province (Argentina). Part 2. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, v. 43, n. 1-2, p. 31-60, 2008.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.

BARREIRO, E. J. Desenho de fármacos a partir de produtos naturais. In: CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. (Ed.). *Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal*. Chapecó: Argos, 2001. p. 237 - 296.

BASSO, L. A. *et al.* The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases - A Review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 6, p. 575-606, 2005.

BOHLMANN, F.; CHEN, Z. Guaianolides from *Ainsliaea fragrans*. *Phytochemistry*, v. 21, n. 8, p. 2120-2122, 1982.

BOHMANN, F. *et al.* Dimeric guainolides and other constituents from *Gochnatia* species. *Phytochemistry* v. 44, p. 1175-1178, 1986.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, p. 248-54, 1976.

BUENO, N. R. *et al.* Medicinal plants used by the Kaiowá and Guarani indigenous populations in the Caarapó reserve, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, v. 19, n. 1, p. 39-44, 2005.

CABRERA, A. L.; KLEIN, R. M. Compostas - 1. Tribo Mutisieae. In: REITZ, R. (Ed.). *Flora Ilustrada Catarinense*. Itajaí, 1973. p. 20 - 35.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B. Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. In: CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. (Ed.). *Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal*. Chapecó: Argos 2001a. p. 77 - 100.

CALIXTO, J. B. Medicamentos fitoterápicos. In: CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. (Ed.). *Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal*. Chapecó: Argos, 2001b. p. 297 - 316.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America - A personal view. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, n. 1-2, p. 131-134, 2005.

CATALAN, C. A. N. V. *et al.* Coumarins and a kaurane from *Gochnatia polymorpha* ssp *polymorpha* from Paraguay. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 31, p. 417-422, 2003.

CHAKRAVARTY, A. K. *et al.* Peracid induced oxidative rearrangements of triterpenoids: Products of new skeleton from bauerenyl acetate. *Tetrahedron*, v. 54, n. 22, p. 6065-6078, 1998.

CHEN, C. H. *et al.* Antitumor agents--CLI. Bis(helenaliny)glutarate and bis(isoalantodiol-B)glutarate, potent inhibitors of human DNA topoisomerase II. *Bioorganica & Medicinal Chemistry*, v. 2, n. 2, p. 137-45, 1994.

COTRAN, R. S.; MAYADAS-NORTON, T. Endothelial adhesion molecules in health and disease. *Pathologie-biologie*, v. 46, n. 3, p. 164-70, 1998.

CRAGG, G. M. *et al.* Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, v. 60, n. 1, p. 52-60, 1997.

DE BOSSCHER, K. *et al.* The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocrine Reviews*, v. 24, n. 4, p. 488-522, 2003.

DE YOUNG, L. M. *et al.* Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*, v. 26, n. 3-4, p. 335-41, 1989.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual review of immunology*, v. 27, p. 519-50, 2009.

EDWARDS, J. C. *et al.* The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. *The Journal of Pathology*, v. 134, n. 2, p. 147-56, 1981.

FARIAS, A. C. M. *et al.* Constituents of *Mochinea polymorpha*. *Journal of Natural Products*, v. 47, p. 363-364, 1984.

FARNSWORTH, N. R. *et al.* Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 63, n. 6, p. 965-81, 1985.

FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience : a journal and virtual library*, v. 2, p. d12-26, 1997.

FENG, F. *et al.* Two novel sesquiterpenoids from *Ainsliaea fragrans* Champ. *Journal of Asian Natural Product Research*, v. 11, n. 10, p. 856-60, 2009.

FERRIS, S. H. Switching previous therapies for Alzheimer's disease to galantamine. *Clinical Therapeutics*, v. 23 Suppl A, p. A3-7, 2001.

GARCIA-RAMALLO, E. *et al.* Resident cell chemokine expression serves as the major mechanism for leukocyte recruitment during local inflammation. *Journal of Immunology*, v. 169, n. 11, p. 6467-73, 2002.

GARLET, T. M. B.; IRGANG, B. E. Medicinal plants used by rural women workers in Cruz Alta, Rio Grande do Sul. *Brazilian Journal of Medicinal Plants*, v. 4, n. 1, p. 9 - 18, 2001.

GERRITSEN, M. E. Physiological and pathophysiological roles of eicosanoids in the microcirculation. *Cardiovascular Research*, v. 32, n. 4, p. 720-32, 1996.

GHANTOUS, A. *et al.* What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? *Drug Discovery Today*, 2010.

GHOSH, S.; KARIN, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, v. 109 Suppl, p. S81-96, 2002.

GILROY, D. W. *et al.* Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 3, n. 5, p. 401-16, 2004.

GOODMAN, L. S. *et al.* *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. 11th. ed. New York: McGraw-Hill, 2006.

GRANGER, D. N.; KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 55, n. 5, p. 662-75, 1994.

HAAS, P. J.; VAN STRIJP, J. Anaphylatoxins: their role in bacterial infection and inflammation. *Immunologic Research*, v. 37, n. 3, p. 161-75, 2007.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in Plants - the Link between Phytochemistry and Medicine. *Phytochemistry*, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.

HARIZI, H. *et al.* Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in molecular medicine*, v. 14, n. 10, p. 461-9, 2008.

HAYDEN, M. S. *et al.* NF-kappaB and the immune response. *Oncogene*, v. 25, n. 51, p. 6758-80, 2006.

HEBBAR, P. B.; ARCHER, T. K. Chromatin remodeling by nuclear receptors. *Chromosoma*, v. 111, n. 8, p. 495-504, 2003.

JUTEL, M. *et al.* Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clinical & Experimental Allergy*, v. 39, n. 12, p. 1786-800, 2009.

KAMINSKA, B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1754, n. 1-2, p. 253-62, 2005.

KASSUYA, C. A. *et al.* Antipyretic and anti-inflammatory properties of the ethanolic extract, dichloromethane fraction and costunolide from *Magnolia ovata* (Magnoliaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 124, n. 3, p. 369-76, 2009.

KATINAS, L. *et al.* The subfamily Mutisioideae (Asteraceae). *Botanical Review*, v. 74, n. 4, p. 649-716, 2008.

KATZUNG, B. G. *Basic & clinical pharmacology*. 9th. ed. New York: Lange Medical Books/McGraw Hill, 2004.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends in molecular medicine*, v. 13, n. 11, p. 460-9, 2007.

KUHR, F. *et al.* Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides*, v. 44, n. 2, p. 145-54, 2010.

KUMAR, V. *et al.* *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. 7th. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005.

LANGER, H. F.; CHAVAKIS, T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 13, n. 7, p. 1211-20, 2009.

LEY, K.; REUTERSHAN, J. Leucocyte-endothelial interactions in health and disease. *Handbook of Experimental Pharmacology*, n. 176 Pt 2, p. 97-133, 2006.

LICHTMAN, M. A.; WILLIAMS, W. J. *Williams hematology*. 7th. ed. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division, 2006.

LÜLLMANN, H. *Color atlas of pharmacology*. 3rd. ed. Stuttgart ; New York: Thieme, 2005.

MACKAY, C. R. Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nature Immunology*, v. 9, n. 9, p. 988-98, 2008.

MARNETT, L. J. The COXIB experience: a look in the rearview mirror. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 49, p. 265-90, 2009.

MCKAY, L. I.; CIDLOWSKI, J. A. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocrine Reviews*, v. 20, n. 4, p. 435-59, 1999.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, n. 7203, p. 428-35, 2008.

MEHTA, D.; MALIK, A. B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiological reviews*, v. 86, n. 1, p. 279-367, 2006.

MESHNICK, S. R. Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *International Journal for Parasitology*, v. 32, p. 1655–1660, 2002.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. D. Drug design based on natural products. *Quimica Nova*, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MOREIRA, A. S. *et al.* Antiinflammatory activity of extracts and fractions from the leaves of *Gochnatia polymorpha*. *Phytotherapy Research*, v. 14, n. 8, p. 638-40, 2000.

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods in Molecular Biology*, v. 225, p. 115-21, 2003.

MORS, W. B. *et al.* *Medicinal plants of Brazil*. Algonac, MI: Reference Publications, 2000. (Medicinal plants of the world 6).

MYERS, N. *et al.* Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. *Nature*, v. 420, n. 6917, p. 846-52, 2002.

NEERMAN, M. F. Sesquiterpene lactones: a diverse class of compounds found in essential oils possessing antibacterial and antifungal properties. *International Journal of Aromatherapy*, v. 13, n. 2-3, p. 114-120, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, D. J. *et al.* The influence of natural products upon drug discovery. *Natural product reports*, v. 17, n. 3, p. 215-34, 2000.

NEWMAN, D. J. *et al.* Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, v. 66, n. 7, p. 1022-37, 2003.

PERRETTI, M.; AHLUWALIA, A. The microcirculation and inflammation: site of action for glucocorticoids. *Microcirculation*, v. 7, n. 3, p. 147-61, 2000.

PERRETTI, M.; GETTING, S. J. Migration of specific leukocyte subsets in response to cytokine or chemokine application in vivo. *Methods in molecular biology*, v. 225, p. 139-46, 2003.

PETRI, B.; BIXEL, M. G. Molecular events during leukocyte diapedesis. *The FEBS Journal*, v. 273, n. 19, p. 4399-407, 2006.

PHILLIPSON, J. D.; ANDERSON, L. A. Ethnopharmacology and Western Medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 25, n. 1, p. 61-72, 1989.

PINTO, A. C. *et al.* Current status, challenges and trends on natural products in Brazil. *Quimica Nova*, v. 25, p. 45-61, 2002.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature reviews. Immunology*, v. 7, n. 10, p. 803-15, 2007.

RAINSFORD, K. D. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Sub-cellular biochemistry*, v. 42, p. 3-27, 2007.

RAJAKARIAR, R. *et al.* COX-2 in inflammation and resolution. *Molecular interventions*, v. 6, n. 4, p. 199-207, 2006.

RATES, S. M. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, n. 5, p. 603-13, 2001.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *New England Journal of Medicine*, v. 353, n. 16, p. 1711-23, 2005.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. *Annual review of pathology*, v. 3, p. 99-126, 2008.

ROTHWARF, D. M.; KARIN, M. The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, v. 1999, n. 5, p. RE1, 1999.

SACILOTTO, A. C. B. *et al.* Ent-kaurene diterpenes from *Gochnatia polymorpha* var. *polymorpha*. *Phytochemistry*, v. 44, p. 659-661, 1997.

SAKLANI, A.; KUTTY, S. K. Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discovery Today*, v. 13, n. 3-4, p. 161-71, 2008.

SALMINEN, A. *et al.* Terpenoids: natural inhibitors of NF-kappaB signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 65, n. 19, p. 2979-99, 2008.

SEAMAN, F. C. Sesquiterpene Lactones as Taxonomic Characters in the Asteraceae. *Botanical Review*, v. 48, n. 2, p. 121-595, 1982.

SEDGWICK, A. D.; LEES, P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. *Agents Actions*, v. 18, n. 3-4, p. 439-46, 1986.

SERHAN, C. N. *et al.* Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *The FASEB Journal*, v. 21, n. 2, p. 325-32, 2007.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHIN, S. G. *et al.* Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 macrophages by sesquiterpene lactones. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, v. 68, n. 23-24, p. 2119-31, 2005.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature reviews. Immunology*, v. 10, n. 2, p. 89-102, 2010.

STEFANELLO, M. E. A. *et al.* Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity of extracts from *Gochnatia polymorpha* (Less) ssp. *floccosa*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 16, p. 525-530, 2006.

STRAPASSON, R. L. B. *Estudo químico e farmacológico das cascas do tronco de Gochnatia polymorpha ssp. floccosa (Asteraceae)*. (2010). (Dissertação de Mestrado) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

TALHOUK, R. S. *et al.* Anti-inflammatory bioactivities in plant extracts. *Journal of Medicinal Food*, v. 10, n. 1, p. 1-10, 2007.

TROWBRIDGE, H. O.; EMLING, R. C. *Inflammation : a review of the process*. 5th. ed. Chicago: Quintessence Pub. Co., 1997.

VALERIO, D. A. *et al.* Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: inhibition of cytokine production-dependent mechanism. *European Journal of Pharmacology*, v. 562, n. 1-2, p. 155-63, 2007.

VEIGA, V. F. *et al.* Medicinal plants: Safe cure? *Quimica Nova*, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VERDI, L. G. *et al.* The *Baccharis* genus (Asteraceae): Chemical, economic and biological aspects. *Quimica Nova*, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

WANG, H. *et al.* Sesquiterpenes from *Ainsliaea fragrans* and their inhibitory activities against cyclooxygenases-1 and 2. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, v. 57, n. 6, p. 597-9, 2009.

WEIGERT, A. *et al.* The liaison between apoptotic cells and macrophages--the end programs the beginning. *Biological Chemistry*, v. 390, n. 5-6, p. 379-90, 2009.

WILLOUGHBY, D. A. In vivo models of inflammation. *Methods in molecular biology*, v. 225, p. 109 - 113, 2003.

WONG, E. T.; TERGAONKAR, V. Roles of NF-kappaB in health and disease: mechanisms and therapeutic potential. *Clinical Science (Lond)*, v. 116, n. 6, p. 451-65, 2009.

YONEKAWA, K.; HARLAN, J. M. Targeting leukocyte integrins in human diseases. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 77, n. 2, p. 129-40, 2005.

YOSHIOKA, H. *et al. Sesquiterpene lactones; chemistry, NMR and plant distribution*. Tokyo: University of Tokyo Press, 1973.